



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE IMUNOTERAPIA COM APAVAC® EM CÃES E GATOS
COM CANCRO – ESTUDO RETROSPETIVO DE 20 CASOS

José Luís Pedrosa Martins

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier

Félix Lourenço

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

Dr. Joaquim José Garcia Pereira

Henriques

ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia Pereira

Henriques

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes

Ferreira São Braz

2018
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE IMUNOTERAPIA COM APAVAC® EM CÃES E GATOS
COM CANCRO – ESTUDO RETROSPETIVO DE 20 CASOS

José Luís Pedrosa Martins

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier

Félix Lourenço

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

Dr. Joaquim José Garcia Pereira

Henriques

ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia Pereira

Henriques

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes

Ferreira São Braz

2018

LISBOA

*Ao meu avô José e à minha avó São,
Por todos os ensinamentos, alegrias, histórias e passeios
Por todos os conselhos, ajuda e proteção*

AGRADECIMENTOS

Todo o processo de reflexão acerca de um determinado período de tempo da nossa vida, sobretudo quando está relacionado com o término de uma fase da nossa vida académica, para além de solitário, e permitir-nos viajar pelo universo das nossas memórias, é doloroso.

Neste momento urge a necessidade de fazer alguns agradecimentos, a pessoas sem as quais não seria possível ter chegado até ao cimo da minha montanha.

Agradeço a todos os docentes com os quais tive o privilégio de privar e aprender, à minha coorientadora de Estágio, Dr.^a Berta São Braz, por toda a amabilidade, disponibilidade e profissionalismo demonstrados nesta viagem de aprendizagem e obviamente, ao orientador Dr. Joaquim Henriques, por toda a dedicação, paciência e conhecimentos que transmitiu.

Agradeço, ainda, a todos os profissionais com os quais cruzei durante o estágio curricular, aos enfermeiros Joana Farinha, Rita Filipe, Cátia Rodrigues e Bruno Rosado pela paciência e ensinamentos preciosos em regime de internamento, bem como a todo o corpo clínico do Hospital Veterinário de Berna, por todo o carinho, amabilidade, conhecimentos e valores transmitidos nesta etapa importante do meu percurso académico.

Agradeço, ainda, aos Drs. Marta Lemos, Anabelle Moraes, Sónia Fonseca, Rui Xavier Santos, Patrícia Duarte e Inês Fonseca, pelos conhecimentos transmitidos na área de Oncologia, Imagiologia e Medicina Interna, pela disponibilidade, amabilidade, profissionalismo e respeito transmitidos durante a estadia no Hospital Veterinário de Berna, um hospital no qual nutro um especial carinho por se ter tornado uma segunda casa.

Ainda agora iniciei esta caminhada, tenho plena consciência que terei que efetuar a minha travessia do deserto. Até agora estive acompanhado, tive sempre a meu lado pessoas a quem recorrer, que lapidavam as minhas dúvidas. Deste modo, não posso deixar de fazer um agradecimento muito especial à minha família, avó Preciosa, pai Carlos, mãe Isabel, irmão João e, aos amigos Diana Bernardo, Diogo Meira, Marta Mariano, Cláudia Santos, Mariana Monteiro, Gonçalo Saramago e Catarina Barros, pela demonstração de valores, que para mim são fulcrais numa relação familiar e de amizade, nomeadamente, paciência, coragem, força, amabilidade, disponibilidade, cooperação, carinho, respeito, companheirismo e amor incondicional. Foi por eles que cheguei até aqui, foram eles que sempre acreditaram e investiram no meu sonho. Sem o seu apoio incondicional, o seu amor e muitos sacrifícios não seria quem sou.

“O teu trabalho vai preencher uma grande parte da tua vida, e a única maneira de ficares realmente satisfeito é fazeres aquilo que acreditas ser um grande trabalho. E a única maneira de fazeres um excelente trabalho é amares o que fazes”
(Steve Jobs)

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE IMUNOTERAPIA COM APAVAC® EM CÃES E GATOS COM CANCRO – ESTUDO RETROSPETIVO DE 20 CASOS

RESUMO

A imunoterapia anti-tumoral apresenta como principal objetivo o desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz, duradoura e isenta de efeitos secundários.

Com este estudo foi efetuada a avaliação da resposta clínica e dos efeitos secundários decorrentes da administração de quimioimunoterapia, procedendo-se à combinação da imunoterapia APAVAC®, uma vacina autóloga baseada nas proteínas de choque térmico (gp96), com a quimioterapia convencional (QC) ou metronômica (QM). Incluíram-se 12 cães e 8 gatos, machos e fêmeas, diagnosticados com várias neoplasias, nomeadamente linfoma (n=8), adenocarcinoma mamário (n=7), melanoma oral (n=1), hemangiopericitoma (n=1), sarcoma de tecidos moles (n=2) e sarcóide felino (n=1). Foram observados 50 efeitos adversos, em 70% (14/20) dos animais em estudo, o que correspondeu a 21 episódios de toxicidade gastrointestinal, 17 de toxicidade hematopoiética, 6 de toxicidade hepática, 3 reações imuno-alérgicas (urticária, linfadenomegália e suspeita de reação autoimune), 2 de toxicidade renal e 1 reação no local de administração (edema). Em 2% dos efeitos secundários registados (edema) existiu uma relação de causalidade com a administração da vacina APAVAC®. Neste estudo, a maioria (92%) dos efeitos adversos registados foram exetáveis aos que se encontram descritos durante a administração de QM ou QC, no que diz respeito à frequência e gravidade, não tendo sido observado um incremento significativo de toxicidade, o que reforça a segurança em relação à administração da imunoterapia com APAVAC®.

Dos cães com linfoma, 25% (2/8) mantiveram-se em remissão completa durante a quimioimunoterapia, 62,5% (5/8) saíram de remissão e, 12,5% (1/8) mantiveram doença estável. Nos restantes cães, um quarto (25%) dos animais manteve-se em remissão completa e, metade (2/4) dos animais foram eutanasiados devido a doença progressiva. Metade das gatas (3/6) com adenocarcinoma mamário foram eutanasiadas devido a doença progressiva e, outra metade (3/6) mantiveram-se em remissão completa da doença, sem recidiva local do tumor mamário nem evidência de metastização. Os gatos com fibrossarcoma e sarcóide felino foram ambos eutanasiados por apresentarem doença progressiva (aumento progressivo das lesões). No que diz respeito à avaliação da resposta clínica, pela natureza retrospectiva do estudo, não se tornou possível a obtenção de mais conclusões objetivas.

Palavras-chave: quimioimunoterapia, APAVAC®, proteínas de choque térmico, gp96, efeitos secundários, resposta clínica.

EVALUATION OF IMMUNOTHERAPY WITH APAVAC® IN CATS AND DOGS WITH CANCER – RETROSPECTIVE STUDY OF 20 CASES

ABSTRACT

The main goal of antitumoral immunotherapy is to develop a effective and long-lasting immune response, free of side effects.

This study aimed to evaluate the clinical response and side/toxic effects induced by chemoimmunotherapy, through the combination of APAVAC®, an autologous vaccine based on heat shock proteins (gp96), with conventional/high-dose chemotherapy (CQ) or metronomic chemotherapy (MQ). Twelve dogs and 8 cats, females and males, were included in this study, which were diagnosed with malignant neoplasms, such as lymphoma (n=8), breast adenocarcinoma (n=7), oral melanoma (n=1), hemangiopericytoma (n=1), soft tissue sarcoma (n=2) and feline sarcoid (n=1).

There were 50 events of toxicity observed, in 70% (14/20) of the animals, which corresponded to 21 episodes of gastrointestinal toxicity, 17 of hematopoietic toxicity, 6 of hepatotoxicity, 3 allergic/immunologic reactions (lymphadenomegaly, autoimmune reaction suspicion and hives), 2 episodes of renal toxicity and 1 local administration side reaction (oedema). In 2% of the adverse events observed (oedema) there was a direct link related to APAVAC® administration. In this study, the majority (92%) of adverse events recorded were expected with those described during MQ or CQ, in terms of frequency and severity, and no significant increase in toxicity has been observed, which reinforces the safety of APAVAC® administration.

Of the immunised dogs for lymphoma neoplasia, 25% (2/8) remained in complete remission during chemoimmunotherapy, 62,5% (5/8) relapse, and 12,5% (1/8) maintained stable disease. In the remaining dogs, a quarter (25%) remained in complete remission during chemoimmunotherapy and half (2/4) were euthanized due to progression of the disease. Half (3/6) of the female cats with breast adenocarcinoma were euthanized due to progression of the disease and the other half (3/6) remained in complete remission, without any signs of local recurrence of the tumour or evidence of metastasis. Regarding the cats with fibrosarcoma and feline sarcoid, the progressive increase in size of their lesions, led to their euthanasia due to progression of the disease. Finally, in regard of the clinical response, it was not possible to gather more objective conclusions due to the retrospective nature of the present study.

Key-words: chemoimmunotherapy, APAVAC®, heat shock proteins, gp96, side effects, clinical response.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMENTOS..... | iii |
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | xii |
| DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR..... | xiv |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| 1 O papel do sistema imunitário no desenvolvimento de neoplasias | 3 |
| 2 Antígenos tumorais..... | 4 |
| 3 Vigilância imunitária | 4 |
| 4 A resposta imunitária durante o processo oncológico..... | 6 |
| 4.1 Resposta imunitária inata | 8 |
| 4.2 Resposta imunitária adquirida | 10 |
| 4.3 Ligação entre as imunidades inata e adquirida..... | 12 |
| 5 Evasão tumoral | 13 |
| 5.1 Imunossupressão mediada por células supressoras de origem mielóide (MDSC) | 14 |
| 5.2 Indução das células Treg..... | 14 |
| 5.3 Comprometimento da função e da ativação das células dendríticas..... | 15 |
| 5.4 Produção de citocinas imunossupressoras..... | 15 |
| 5.5 Não reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imunitário | 17 |
| 6 Imunoterapia anti-tumoral..... | 17 |
| 6.1 Imunoterapia não específica..... | 17 |
| 6.1.1 Modificadores de resposta biológica..... | 18 |
| 6.1.2 Citocinas recombinantes | 18 |
| 6.2 Imunoterapia ativa..... | 19 |
| 6.2.1 Vacinas anti-tumorais: indicações e perspectivas futuras..... | 19 |
| 6.2.2 Vacinas com péptidos/proteínas..... | 20 |
| 6.2.3 Vacinas genéticas | 20 |
| 6.2.4 Vacinas celulares | 21 |
| 6.3 Imunoterapia passiva | 21 |
| 6.3.1 Transferência adotiva de células | 22 |
| 6.3.2 Anticorpos monoclonais..... | 22 |
| 7 Vacinas anti-tumorais baseadas nas proteínas de choque térmico | 22 |
| 7.1 Proteínas de choque térmico (HSPs) | 22 |
| 7.1.1 Funções das proteínas de choque térmico | 22 |
| 7.1.2 O papel das HSP nas neoplasias | 24 |
| 7.2 Vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs | 25 |
| 7.2.1 Estudos com vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs | 27 |
| 7.2.1.1 Vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs em Medicina Humana | 28 |
| 7.2.2 Limitações na utilização de vacinas baseadas nas HSPs..... | 29 |
| 7.3 APAVAC® - Vacina anti-tumoral baseada nas HSPs em Medicina Veterinária | 30 |
| 7.3.1 Preparação da vacina..... | 30 |
| 7.3.2 Mecanismo de ação..... | 30 |
| 7.3.2.1 Resposta imunitária adquirida..... | 31 |
| 7.3.2.2 Resposta imunitária inata..... | 32 |
| 7.3.3 Indicações de utilização..... | 32 |
| 7.3.3.1 A quimioterapia metronómica associada à imunoterapia | 33 |
| 7.3.3.2 A quimioterapia convencional associada à imunoterapia | 34 |
| 7.3.4 Protocolo vacinal | 35 |
| 7.3.5 Efeitos secundários | 35 |
| 7.3.6 Contra-indicações..... | 36 |
| 7.3.7 Interações medicamentosas | 36 |

| | |
|---|----|
| 7.3.8 Eficácia clínica..... | 36 |
| PARTE II - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA E DOS EFEITOS SECUNDÁRIOS DA IMUNOTERAPIA APAVAC® EM CÃES E GATOS COM CANCRO - ESTUDO RETROSPETIVO DE 20 CASOS | 38 |
| 1 Objetivos | 39 |
| 2 Materiais e métodos | 39 |
| 2.1 Animais | 39 |
| 2.1.1 Critérios de inclusão | 39 |
| 2.1.2 Critérios de exclusão | 40 |
| 2.2 Preparação da vacina..... | 40 |
| 2.3 Estadiamento clínico | 41 |
| 2.4 Terapêutica | 42 |
| 2.5 Avaliação da resposta clínica | 45 |
| 2.6 Descrição e classificação dos efeitos secundários | 45 |
| 2.7 Análise estatística | 47 |
| 3 Resultados | 48 |
| 3.1 Caracterização da amostra..... | 48 |
| 3.1.1 Caracterização da amostra quanto ao género | 48 |
| 3.1.2 Caracterização da amostra quanto à idade ao diagnóstico..... | 48 |
| 3.1.3 Caracterização da amostra quanto ao tipo de neoplasia | 48 |
| 3.2 Exames complementares de diagnóstico | 48 |
| 3.3 Classificação histológica e localização das neoplasias..... | 50 |
| 3.4 Estadiamento clínico | 51 |
| 3.4.1 Neoplasias felinas | 51 |
| 3.4.2 Neoplasias caninas..... | 52 |
| 3.5 Terapêutica | 53 |
| 3.5.1 Cirurgia..... | 53 |
| 3.5.1.1 Neoplasias felinas..... | 53 |
| 3.5.1.2 Neoplasias caninas..... | 53 |
| 3.5.2 Quimioimunoterapia..... | 53 |
| 3.5.2.1 Neoplasias felinas..... | 54 |
| 3.5.2.2 Neoplasias caninas..... | 54 |
| 3.6 Avaliação dos efeitos secundários durante a quimioimunoterapia | 55 |
| 3.6.1 Reações imuno-alérgicas | 57 |
| 3.6.2 Alterações no local de administração | 57 |
| 3.6.3 Toxicidade gastrointestinal | 58 |
| 3.6.4 Toxicidade renal | 58 |
| 3.6.5 Toxicidade hepática..... | 59 |
| 3.6.6 Toxicidade hematopoiética | 59 |
| 3.7 Resposta clínica | 60 |
| 3.7.1 Neoplasias caninas..... | 60 |
| 3.7.1.1 Linfoma..... | 60 |
| 3.7.1.2 Outras neoplasias | 61 |
| 3.7.2 Neoplasias felinas | 61 |
| 3.7.2.1 Adenocarcinoma mamário | 61 |
| 3.7.2.2 Outras neoplasias | 62 |
| 4 Discussão | 62 |
| 4.1 Caracterização da amostra..... | 62 |
| 4.2 Quimioimunoterapia | 64 |
| 4.3 Avaliação dos efeitos secundários associados à quimioimunoterapia | 65 |
| 4.4 Avaliação da resposta clínica | 70 |
| 4.5 Limitações do estudo..... | 73 |
| CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 77 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 78 |
| PARTE III - ANEXOS..... | 89 |
| Anexo 1: KIT para preparação de 8 vacinas autólogas para uso veterinário (adaptado de Urodelia, 2018; Simonet et al., 2013)..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| Anexo 2: Sistemas de estadiamento clínico para o linfoma, carcinoma mamário, melanoma oral, sarcoma de tecidos moles e sarcóide felino..... | 93 |
| Anexo 3: Classificação, em graus, dos efeitos secundários avaliados durante a quimioimunoterapia. | 97 |
| Anexo 4: Efeitos secundários relacionados com a administração de fármacos citotóxicos. | 101 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Descrição aproximada do tempo de estágio (horas em percentagem) por cada serviço acompanhado no Hospital Veterinário de Berna..... | xiv |
| Figura 2: Representação esquemática das diferentes subpopulações de células T (adaptado de Tizard, 2012)..... | 7 |
| Figura 3: Principais diferenças entre as células Th1 e Th2, bem como algumas das suas funções (adaptado de Tizard, 2012). | 7 |
| Figura 4: As respostas imunitárias inata e adquirida no decorrer da doença oncológica, bem como a ligação entre os dois tipos de imunidade (adaptado de Pandya et al., 2016). | 8 |
| Figura 5: Efeitos anti-tumorais mediados pelas células da resposta imunitária inata (adaptado de Regan & Dow, 2015)..... | 10 |
| Figura 6: Sinais de co-estimulação e co-inibição estabelecidos entre as células T naïve e as células APC (adaptado de Abbas et al., 2016)..... | 11 |
| Figura 7: Apresentação antigénica dos antígenos tumorais nos gânglios linfáticos regionais (adaptado de Abbas et al., 2016)..... | 12 |
| Figura 8: Mecanismos de evasão tumoral (adaptado de Guth & Dow, 2012)..... | 13 |
| Figura 9: Regulação e funções das proteínas de choque térmico, quando induzidas pelo stress fisiológico, ambiental ou patológico (adaptado de Chatterjee & Burns, 2017)..... | 23 |
| Figura 10: KIT APAVAC®: material (esquerda), homogeneização da amostra tumoral (centro) e solventes disponibilizados no KIT (direita) [originais do autor]. | 30 |
| Figura 11: Mecanismos imunitários (respostas imunitárias inata e adquirida) envolvidos na vacina APAVAC® (adaptado de Zhang & Zheng, 2013). | 31 |
| Figura 12: Distribuição do tipo de neoplasia nos grupos de canídeos e felídeos..... | 48 |
| Figura 13: Descrição dos exames complementares de diagnóstico efetuados no linfoma canino..... | 49 |
| Figura 14: Descrição das técnicas de imunofenotipagem efetuadas no linfoma canino. | 49 |
| Figura 15: Distribuição dos estádios clínicos no grupo de gatas com adenocarcinoma mamário..... | 51 |
| Figura 16: Distribuição dos estádios clínicos no linfoma canino..... | 52 |
| Figura 17: Caracterização do número de imunizações com a vacina APAVAC®, efetuadas no decorrer da quimioimunoterapia. | 54 |
| Figura 18: Classificação dos episódios gastrointestinais quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011). | 58 |
| Figura 19: Classificação da toxicidade hepática quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011)..... | 59 |
| Figura 20: Classificação da toxicidade hematopoiética quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011)..... | 59 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação dos diferentes grupos de antígenos tumorais reconhecidos pelas células T (adaptado de Abbas et al., 2016)..... | 4 |
| Tabela 2: Fatores químicos e celulares que interferem na vigilância imunitária. | 5 |
| Tabela 3: Comparação das respostas imunitárias inata e adquirida (adaptado de Tizard, 2012; Pandya et al., 2016)..... | 6 |
| Tabela 4: As funções das citocinas imunossupressoras no contexto da evasão tumoral... | 15 |
| Tabela 5: Comparação da quimioterapia relativamente às imunoterapias anti-tumorais (adaptado de Bergman, 2017). | 19 |
| Tabela 6: Efeitos da administração de hidroxiapatite por via subcutânea, em murganhos (adaptado de Ciocca et al., 2007). | 27 |
| Tabela 7: Protocolos terapêuticos instituídos nos doentes em estudo, em associação com a imunoterapia APAVAC®..... | 43 |
| Tabela 8: Protocolos quimioterápicos instituídos nas neoplasias em estudo, assim como o número de animais aos quais foi administrado os respetivos protocolos. | 43 |
| Tabela 9: Representação esquemática do protocolo CHOP, realizado nos cães com linfoma e baseado no protocolo UW-Madison-Short (adaptado de Vail, Pinkerton, Young, 2013). | 44 |
| Tabela 10: Critérios de avaliação da resposta clínica em neoplasias sólidas e no linfoma canino (adaptado de Nguyen et al., 2015; Vail et al., 2010). | 45 |
| Tabela 11: Descrição da gravidade dos efeitos secundários em graus (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011). | 46 |
| Tabela 12: Valores de referência para os parâmetros sanguíneos considerados na avaliação das toxicidades hematopoiética, renal e hepática, no decorrer da quimioimunoterapia. | 47 |
| Tabela 13: Localização das neoplasias no grupo de gatas com adenocarcinoma mamário. | 50 |
| Tabela 14: Descrição dos estádios clínicos, segundo a OMS/WHO, em cada um dos animais em estudo, no grupo de canídeos e felídeos. | 52 |
| Tabela 15: Efeitos secundários à quimioimunoterapia. Frequência absoluta e relativa, nos grupos de canídeos e felídeos. | 55 |
| Tabela 16: Classificação dos efeitos secundário relativamente à sua gravidade e, respetiva frequência absoluta, de acordo com VCOG-CTCAE (2011)..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------------|---|
| ADCC: | Citotoxicidade celular dependente de anticorpos, do inglês “antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” |
| ADN: | Ácido desoxirribonucleico |
| AINE: | Anti-inflamatório não esteróide |
| ALP: | Fosfatase alcalina, do inglês “alkaline phosphatase” |
| ALT: | Alanina aminotransferase, do inglês “alanine aminotransferase” |
| APC: | Célula apresentadora de antígenos, do inglês “antigen-presenting cell” |
| ARN: | Ácido ribonucleico |
| ATP: | Trifosfato de adenosina |
| BID: | Duas vezes por dia |
| CCL: | Ligandos das quimiocinas |
| CD: | <i>Cluster</i> de diferenciação |
| CD40L: | Ligando do <i>cluster</i> de diferenciação 40 |
| CDC: | Citotoxicidade mediada pelo sistema de complemento, do inglês “complement-dependent cytotoxicity” |
| COX: | Ciclooxigenase |
| CSF: | Fator de estimulação de colônias, do inglês “Colony stimulating factor” |
| CTLA-4: | Proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos, do inglês “Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4” |
| DLBCL: lymphoma” | Linfoma difuso de grandes células B, do inglês “Diffuse large B-cell lymphoma” |
| EDTA: | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EOD: | Do inglês “Every other day” |
| Fc: | Fragmento cristalizável |
| GM-CSF: | Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” |
| HSP: | Proteína de choque térmico, do inglês “Heat shock protein” |
| ICOS: | Fator co-estimulador induzível, do inglês “inducible co-stimulator” |
| IFN: | Interferão |
| IL: | Interleucina |
| IV: | Endovenoso |
| LSS: | Tempo de sobrevivência específico do linfoma, do inglês “lymphoma-specific survival” |
| MCP: | Proteína quimiotática dos monócitos, do inglês “Monocyte chemoattractant protein” |
| MDSC: | Célula supressora de origem mielóide, do inglês “Myeloid-derived suppressor cells” |
| MHC: | Complexo maior de histocompatibilidade |
| MICA: | Proteína A relacionada com o MHC-I, do inglês “MHC class I chain-related protein A” |
| MICB: | Proteína B relacionada com o MHC-I, do inglês “MHC class I chain-related protein B” |
| MIP: | Proteína inflamatória de macrófagos, do inglês “Macrophage Inflammatory Proteins” |
| mRNA: | RNA mensageiro |
| NADPH: | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido |
| NaHCO ₃ : | Bicarbonato de sódio |
| NF-Kb: | Fator nuclear-kB |
| NK: | <i>Natural killer</i> |
| NKG2D: | Recetores natural-killer grupo 2, membro D |
| NLR: | Do inglês “NOD-like receptor” |
| NO: | Monóxido de azoto |
| OMS: | Organização mundial de saúde |
| PAAF: | Punção aspirativa de agulha fina |

| | |
|----------------|--|
| PD-1: | Proteína 1 de morte celular programada, do inglês “Programed cell death protein 1” |
| PD-L1: | Ligando de PD-1 |
| PO: | <i>Per os</i> |
| QC: | Quimioterapia convencional |
| QM: | Quimioterapia metronômica |
| RLO: | Radicais livres de oxigênio |
| Rpm: | Rotações por minuto |
| S100A9: | Proteína de ligação ao cálcio S100A9 |
| SC: | Subcutâneo/a |
| SID: | Uma vez por dia |
| TAM: | Macrófagos associados ao tumor, do inglês “Tumor-associated macrophages” |
| TCHT: | Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia |
| TCR: | Recetor das células T, do inglês “T-cell receptor” |
| TGF- β : | Fator de crescimento transformante β , do inglês “Transforming growth factor β ” |
| Th: | <i>T helper</i> |
| TID: | Três vezes por dia |
| TLR: | Do inglês “Toll-like receptors” |
| TNF: | Fator de necrose tumoral, do inglês “Tumor necrosis factor” |
| Treg: | Células T reguladoras |
| TTP: | Tempo até à progressão da doença, do inglês “Time to progression” |
| VEGF: | Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês “Vascular endothelial growth factor” |
| WHO: | Do inglês “World Health Organization” |

DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular que serviu de base à dissertação de mestrado integrado agora apresentada foi realizado no Hospital Veterinário de Berna, da *Onevet Group*, na área de Medicina e Cirurgia em animais de companhia. O estágio curricular teve a duração de 6 meses, com início no dia 17 de Setembro e conclusão no dia 17 de Março. A carga horária total terá sido aproximadamente de 1010 horas.

No decorrer do estágio curricular foram acompanhados todos os serviços do hospital, nomeadamente, Internamento, Patologia Clínica, Cardiologia, Imagiologia, Cirurgia, Anestesiologia, Ortopedia, Oftalmologia, Dermatologia, Oncologia e Neurologia. A carga horária foi repartida em turnos diários de 8 horas, correspondendo a 40 horas semanais, nos serviços de Internamento, Cirurgia, Oncologia, Imagiologia e Medicina Interna (consultas gerais e outras especialidades veterinárias).

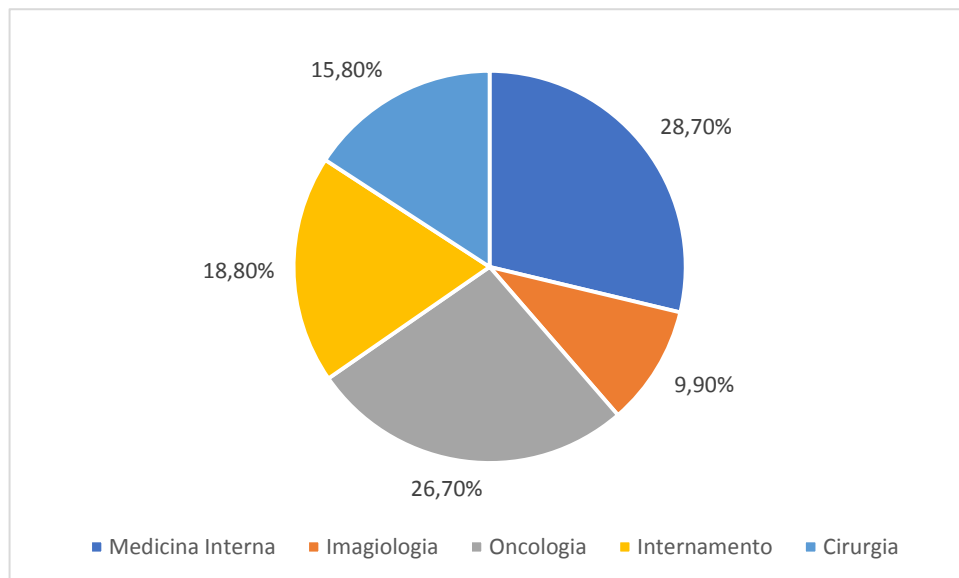
No serviço de Cirurgia, assistiram-se a várias cirurgias no âmbito da cirurgia geral, da oncologia (mastectomia, esplenectomia, hepatectomia parcial, excisão de massas ou nódulos, hemimandibulectomia, excisão de gânglios linfáticos metastáticos e, realização de biópsias intestinais, ósseas, de nódulos e massas), da ortopedia, da oftalmologia, da urologia (cistotomia, ureterostomia/uretrostomia para remoção de cálculos e colocação de *bypass* renal), da gastroenterologia (biópsias intestinais, hepáticas, enterectomia, esplenectomia, e remoção de corpos estranhos), da estomatologia, e da endoscopia (esterilização por mínima invasão, broncoscopia, rinoscopia, laparoscopia e colonoscopia). Além disso, e também em ambiente cirúrgico, foi possível assistir e participar em outras terapias oncológicas, nomeadamente, a criocirurgia e a eletroquimioterapia.

Sendo o Hospital Veterinário de Berna, um hospital de referência em Oncologia, a maioria das consultas assistidas faziam parte desta especialidade veterinária. No decorrer do estágio, foram assistidas várias consultas de oncologia (consultas de 1ª vez, de seguimento, de 2ª opinião e pré-cirúrgicas), sessões de quimioterapia, realização de citologias por aposição ou PAAF, bem como seguimento e participação nas sessões de imunoterapia, com especial ênfase na vacina APAVAC[®], que será a temática abordada nesta dissertação.

Semanalmente, no decorrer do estágio curricular realizava-se o “Journal Club”, um tempo dedicado à apresentação de conteúdos médico-científicos variados, levado a cabo por um médico veterinário ou estagiário, ocorrendo, posteriormente, a discussão e a partilha de casos clínicos relacionados com o tema. No âmbito do “Journal Club”, o estudante teve a cargo a responsabilidade de dinamização e apresentação do tema “Imunoterapia em animais de companhia com a vacina APAVAC[®]”, por se tratar do tema abordado na dissertação de mestrado integrado.

Relativamente à escolha do tema abordado na dissertação, “Avaliação da utilização de imunoterapia com APAVAC[®] em cães e gatos com cancro – estudo retrospectivo de 20 casos”, foi tido em conta vários aspetos, nomeadamente, o interesse pessoal na área de

Oncologia, bem como, o fato de se tratar de uma temática muito recente, promissora e com evolução exponencial na área da Oncologia Veterinária. Além disso, o Hospital Veterinário de Berna, tratando-se de um centro de referência em Oncologia Veterinária, proporcionou uma elevada casuística de animais passíveis de realizarem a imunoterapia APAVAC[®], contribuindo, assim, para a recolha de um número aceitável de casos para a elaboração desta dissertação.



INTRODUÇÃO

A maioria dos protocolos terapêuticos utilizados em doença neoplásica extensa ou metastizada, cujo tratamento cirúrgico é impossível, baseia-se na quimioterapia ou na radioterapia. Ambas as modalidades terapêuticas causam danos nos tecidos sãos, estando associadas a vários efeitos secundários. Contudo, com os avanços técnico-científicos e a manipulação da imunidade específica do tumor, tornou-se possível o desenvolvimento da imunoterapia anti-tumoral, uma modalidade terapêutica inovadora capaz de erradicar seletivamente as células neoplásicas, bem como reduzir os danos nos tecidos sãos do doente (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2016).

O principal objetivo da imunoterapia anti-tumoral consiste no desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz, duradoura e isenta de efeitos secundários. Contudo, a imunotolerância gerada pelo tumor em si ou pelo próprio sistema imunitário dificultam o sucesso desta modalidade terapêutica (Guth & Dow, 2012). No âmbito da imunoterapia anti-tumoral, as principais estratégias utilizadas providenciam ao doente efetores anti-tumorais (anticorpos e células T), imunização contra a sua própria neoplasia e, a estimulação da sua resposta imunitária anti-tumoral (Abbas et al., 2016).

Assim sendo, o conhecimento sobre o sistema imunitário e as suas vias reguladoras, permitem o desenvolvimento de imunoterapias cada vez mais eficazes. A imunoterapia anti-tumoral tem, ainda, o potencial de operar em conjunto com e, eventualmente, aperfeiçoar a eficácia da quimioterapia, da radioterapia, da cirurgia e de outras terapias anti-neoplásicas (Guth & Dow, 2012).

Dado o interesse do estudante na área de Oncologia Veterinária e no futuro a ela inerente, a imunoterapia anti-tumoral constitui o tema base desta dissertação. O estudo, desenvolvido em paralelo com o estágio curricular, consistiu na avaliação da utilização de imunoterapia com APAVAC[®], uma vacina anti-tumoral baseada nas proteínas de choque térmico (HSP), em cães e gatos com cancro.

Na primeira parte da dissertação, será desenvolvida uma breve revisão bibliográfica sobre o tema da imunoterapia em Medicina Veterinária, o papel das HSPs no desenvolvimento de uma estratégia de imunoterapia ativa, o mecanismo imunológico, a eficácia e os efeitos secundários associados à administração de imunoterapia com APAVAC[®].

Na segunda parte, serão descritos os casos clínicos nos quais se instituiu a imunoterapia APAVAC[®], bem como os efeitos secundários observados durante a administração de quimioimunoterapia.

Parte I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 O papel do sistema imunitário no desenvolvimento de neoplasias

O sistema imunitário é constituído por diversas moléculas bioativas, citocinas, proteínas e, células que coletivamente são responsáveis por desencadear uma resposta bioquímica e física capaz de reconhecer e defender o organismo contra proteínas ou antígenos *non-self* (Janeway, Travers, Walport, & Al, 2001).

O sistema imunitário é capaz de produzir uma resposta imunitária contra vários microrganismos e antígenos estranhos ao organismo (antígenos *non-self*), mas, normalmente, não reage contra os antígenos próprios produzidos pelo hospedeiro (antígenos *self*) (Tizard, 2012).

Para que o crescimento celular seja normal é essencial haver controlo durante a divisão celular, para esta não ocorrer de modo descontrolado. Contudo, durante este processo é possível o desenvolvimento de múltiplas mutações genéticas induzidas por químicos, radiações ou vírus, entre outros fatores. Destas mutações resulta a expressão anormal de proteínas na superfície celular. Em última instância, a regulação e o controlo fisiológico da multiplicação celular cessa, dando lugar a uma multiplicação celular descontrolada (Tizard, 2012). Estas células neoplásicas deixam de ser responsivas aos reguladores normais do crescimento celular: inibidores de crescimento, fatores de crescimento celular e microambiente, inibição por contato, requisitos de ligação molecular e apoptose celular. As células neoplásicas exibem, ainda, crescimento autónomo, não dependem dos sinais de crescimento celular exógenos e são capazes de criar o seu próprio suprimento sanguíneo (angiogénese tumoral) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Paul Ehrlich (1909) foi um dos primeiros cientistas a expor a ideia de que o sistema imunitário desenvolvia uma resposta imunitária contra as células neoplásicas do *self*. Este autor acreditava que a prevalência das neoplasias seria maior caso não existisse o efeito protetor conferido pelo sistema imunitário, isto é, a vigilância imunitária (Ehrlich, 1909, citado por Kelly, McNeel, Fisch, & Malkovsky, 2018).

Assim, uma das principais funções do sistema imunitário consiste no reconhecimento de proteínas estranhas ao organismo produzidas durante o processo neoplásico, não apenas as mutantes como também as formas alteradas das proteínas *self*. Estas proteínas constituem os designados antígenos tumorais (Guth & Dow, 2012).

O sistema imunitário desempenha pois um papel crucial ao controlar os processos neoplásicos (Guth & Dow, 2012). Corroborando esta afirmação, vários estudos revelaram uma maior propensão no desenvolvimento de neoplasias em indivíduos imunodeprimidos (Tizard, 2012). Noutros estudos, em alguns casos foi possível a remissão espontânea da neoplasia sem o auxílio de qualquer terapêutica anti-neoplásica, o que sugere a importância da resposta imunitária no combate às neoplasias (Guth & Dow, 2012).

2 Antígenos tumorais

A ocorrência de mutações espontâneas nos genes reguladores de genes desencadeia o desenvolvimento de células neoplásicas. Destas mutações resultam antígenos novos, específicos do tumor (Tizard, 2012) e, reconhecidos como *non-self* pelo sistema imunitário (Abbas et al., 2016).

A classificação dos diferentes grupos de antígenos tumorais, bem como os respectivos exemplos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos diferentes grupos de antígenos tumorais reconhecidos pelas células T (adaptado de Abbas et al., 2016).

| | | Exemplos |
|--------------------|---|--|
| Antígenos tumorais | Proteínas <i>self</i> mutantes que não contribuem para a gênese tumoral | Várias proteínas <i>self</i> mutantes sujeitas a glicosilação anormal após a tradução do mRNA (Abbas et al., 2016; Tizard, 2012) |
| | Produto dos oncogenes ou mutações nos genes supressores de tumores | Produtos dos oncogenes: mutações nos genes RAS e BCR/ABL (Abbas et al., 2016; Chow, 2010) Produtos dos genes supressores de tumores: mutações na proteína p53 (Vogelstein & Kinzler, 2004) |
| | Expressão aberrante das proteínas celulares <i>self</i> | Antígeno PSA em neoplasias prostáticas (Stenman, Leinonen, Zhang, & Finne, 1999), tirosinase em tumores melanóticos de cães e cavalos (Phillips et al., 2012), gp100 e antígenos <i>cancer/testis</i> (Abbas et al., 2016) |
| | Antígenos de origem viral (vírus oncogênicos) | Antígeno FOCMA na leucemia e fibrossarcoma de origens virais (Snyder, Hardy, Zuckerman, & Fleissner, 1978; Tizard, 2012), proteínas E6 e E7 no carcinoma do colo do útero secundário à infecção por HPV (Lipari, McGibbon, Wardrop, & Cordingley, 2001). |

Legenda: mRNA, RNA mensageiro; PSA, antígeno específico da próstata; FOCMA, antígeno do oncornavírus felino associado à membrana celular; HPV, papilomavírus humano.

3 Vigilância imunitária

Burnet (1957), ao estudar a resposta linfocitária face aos antígenos tumorais, conjecturou que o sistema imunitário respondia ativamente e era capaz de eliminar as células neoplásicas. Com base na sua ideia inicial surgiu, na comunidade científica, o conceito de vigilância imunitária (Burnet, 1957, citado por Kelly et al., 2018).

O princípio da vigilância imunitária baseia-se no reconhecimento da expressão de proteínas alteradas ou exclusivas do tumor e, na eliminação de células transformadas, contrariando, assim, o estabelecimento do processo neoplásico (Kelly et al., 2018).

O sistema imunitário assume, assim, extrema importância na prevenção do estabelecimento da doença neoplásica. Para tal, o sistema imunitário (1) protege o hospedeiro para o desenvolvimento de neoplasias induzidas por vírus, ao promover a eliminação de infecções virais; (2) previne o desenvolvimento do ambiente inflamatório indutor da génese tumoral, através da eliminação dos agentes patogénicos e inibição da resposta inflamatória; e (3) identifica e elimina as células neoplásicas que expressem à sua superfície antígenos tumorais, como resposta ao stress celular (Kaja et al., 2017).

No decorrer da vigilância imunitária, vários estudos demonstraram a importância das respostas imunitárias inata e adquirida no reconhecimento e eliminação das células neoplásicas (Girardi et al., 2001; Simson et al., 2007; Street, Cretney, & Smyth, 2001). Na tabela 2 são apresentados os fatores químicos e celulares envolvidos na vigilância imunitária.

Tabela 2: Fatores químicos e celulares que interferem na vigilância imunitária.

| Componentes celulares | Mediadores químicos |
|---|---|
| Linfócitos T ¹ , linfócitos B, células NK, T killer e eosinófilos ² | IFN- γ ³ , interferão do tipo 1, IL-12 e TNF- α ² |

Legenda: ¹(Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001); ²(Girardi et al., 2001; Simson et al., 2007; Street et al., 2001); ³(Dighe, Richards, Old, & Schreiber, 1994; Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001).

Estudos em murganhos demonstraram que os linfócitos T, através da produção direta ou indireta de IFN- γ , impedem o desenvolvimento de sarcomas induzidos por 3-metilcolantreno (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Demonstrou-se ainda, uma maior imunogenicidade dos tumores inoculados em murganhos imunodeprimidos, comparativamente aos inoculados em murganhos imunocompetentes (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002; Shankaran et al., 2001). Estas constatações conduziram a modificações no conceito inicial de vigilância imunitária, surgindo, deste modo, uma hipótese diferente da inicial e intitulada imunoedição tumoral (Guth & Dow, 2012).

De um modo geral, a imunoedição tumoral ocorre segundo 3 etapas: (1) eliminação, com destruição imunitária das células neoplásicas imunogénicas, embora, as células neoplásicas com imunogenicidade reduzida serem capazes de resistir à resposta anti-tumoral produzida; (2) equilíbrio, onde é estabelecido um estado de equilíbrio entre o crescimento tumoral e a sua destruição pelo sistema imunitário; e, por último, (3) evasão tumoral, caracterizada pelo crescimento exponencial da neoplasia, como resposta à diminuição da imunogenicidade tumoral, imunossupressão e crescimento rápido das células neoplásicas (Schreiber & Podack, 2009).

A imunoeedição tumoral descreve, assim, os mecanismos imunitários responsáveis pela proteção do hospedeiro e pela modelação tumoral, ambos importantes na prevenção e modelação da doença oncológica. Esta hipótese elucida, também, o papel do sistema imunitário no sobrecrecimento das células neoplásicas menos imunogénicas (Kaja et al., 2017; Kelly et al., 2018).

No âmbito da doença oncológica, a imunoeedição promove a seleção das células neoplásicas e gera um estado imunitário não protetivo sobre algumas neoplasias, além de favorecer o desenvolvimento de anergia imunitária, tolerância ou indiferença perante as células neoplásicas (Dunn et al., 2002).

4 A resposta imunitária durante o processo oncológico

O sistema imunitário é dividido em dois componentes primários: a resposta imunitária inata e a adquirida. As principais diferenças entre os dois componentes do sistema imunitário estão descritas na tabela 3.

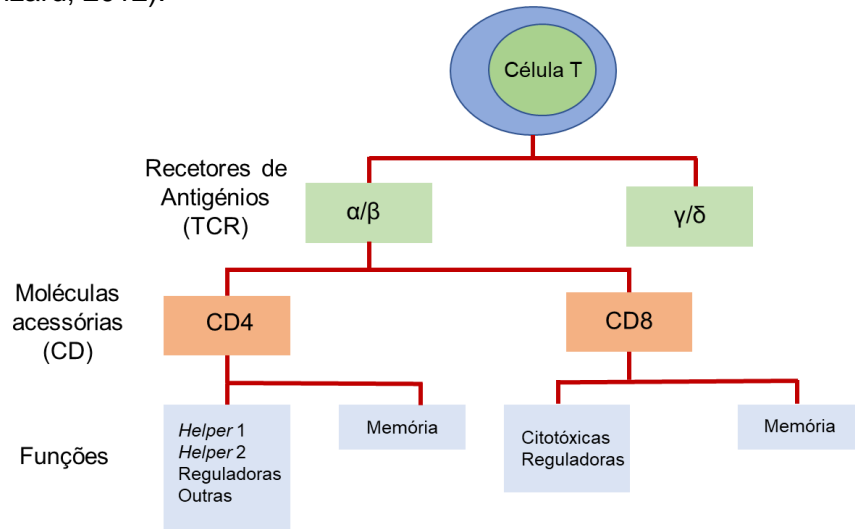
Tabela 3: Comparação das respostas imunitárias inata e adquirida (adaptado de Tizard, 2012; Pandya et al., 2016).

| | Resposta imunitária inata | Resposta imunitária adquirida |
|-----------------------------|---|---|
| Constituintes celulares | Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, outras células inflamatórias e células NK | Células B (resposta humoral) e T (resposta celular) |
| Constituintes não celulares | Barreiras físico-químicas Proteínas de complemento Citoquinas | Citoquinas Anticorpos |
| Início | Rápido (minutos a horas) | Lento (dias a semanas) |
| Especificidade | Reduzida | Elevada (antígenos) |
| Memória | Ausente | Presente |
| Eficácia | Não melhora com a exposição | Melhora com a exposição |

Legenda: NK, *natural killer*.

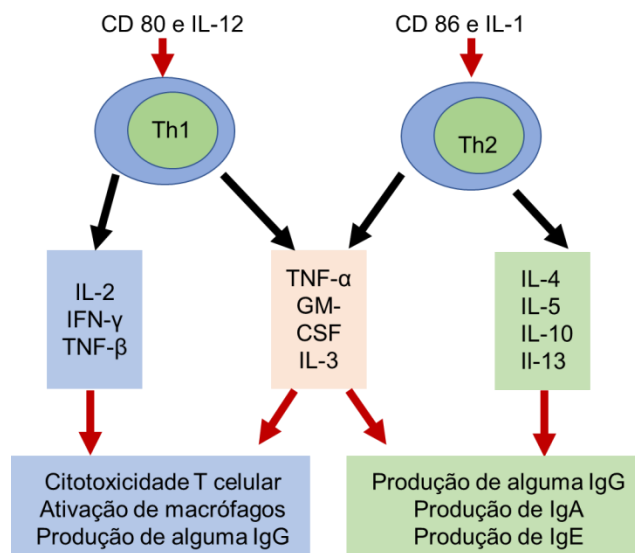
Na figura 2 estão esquematizadas as diferentes subpopulações de células T, com base nos seus recetores de antígenos (TCR - do inglês “T-cell receptor”) e nas suas moléculas acessórias (CD – “Cluster” de diferenciação), que sustentam a sua atividade e, em última instância as suas funções.

Figura 2: Representação esquemática das diferentes subpopulações de células T (adaptado de Tizard, 2012).



As células T CD4⁺ podem diferenciar-se em células T *helper* 1 (Th1), células T *helper* 2 (Th2), e em células T reguladoras (Treg) [figura 2], dependendo do microambiente existente (no que diz respeito às citocinas) e, do sinal co-estimulador (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012; Tizard, 2012). As células Th1 desempenham um papel importante na autoimunidade (Prete, 1992). Por outro lado, as células Th2 desempenham o seu papel na regulação da resposta imunitária perante os agentes patogénicos extracelulares e, nas doenças alérgicas (Luckheeram et al., 2012). As células Treg reduzem a resposta inflamatória (Luckheeram et al., 2012) e, suprimem a função das células T CD4⁺ e CD8⁺ (Yamaguchi & Sakaguchi, 2006). Na figura 3 estão representadas as principais diferenças entre as células Th1 e Th2, bem como os sinais co-estimuladores e as citocinas produzidas por ambas as populações celulares.

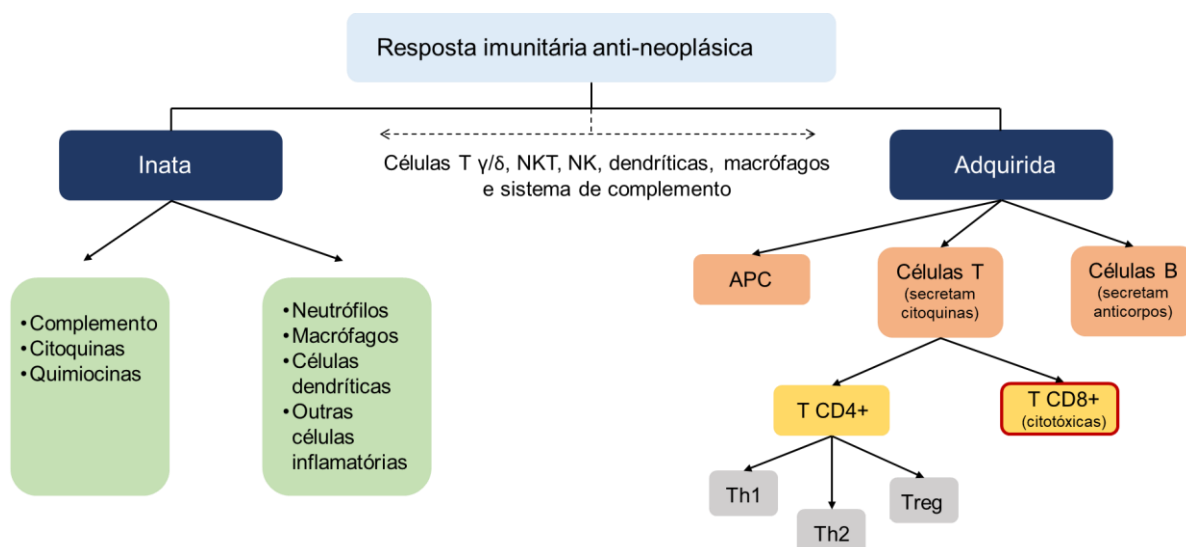
Figura 3: Principais diferenças entre as células Th1 e Th2, bem como algumas das suas funções (adaptado de Tizard, 2012).



No que diz respeito à imunidade humoral (mediada por anticorpos), a ativação dos linfócitos B e, consequentemente, a produção de anticorpos pelos plasmócitos pode ser mediada pelas células T *helper* ou por mecanismos não dependentes das células imunitárias (Janeway et al., 2001).

Durante a gênese tumoral são ativados vários componentes da imunidade inata, de modo a diminuir a inflamação associada ao processo neoplásico, ocorrendo, igualmente, a ativação da resposta imunitária adquirida, específica e contra as células neoplásicas [figura 4] (Pandya, Murray, Pollok, & Renbarger, 2016). Cabe às células T da resposta imunitária adquirida diferenciarem as células normais do organismo (*self*) das células neoplásicas (Tizard, 2012).

Figura 4: As respostas imunitárias inata e adquirida no decorrer da doença oncológica, bem como a ligação entre os dois tipos de imunidade (adaptado de Pandya et al., 2016).



Legenda: APC, células apresentadoras de antígenos.

4.1 Resposta imunitária inata

As modificações genéticas e epigenéticas, que ocorrem nas células neoplásicas, induzem a expressão de antígenos tumorais na superfície celular (Pardoll, 2003). Estes antígenos podem ser reconhecidos pelo sistema de complemento, desencadeando, assim, uma resposta imunitária do tipo CDC – citotoxicidade mediada pelo sistema de complemento (Pio, Corrales, & Lambris, 2014). Vários estudos em doentes oncológicos, demonstraram o aumento de proteínas do sistema de complemento, a nível local, sistêmico ou no próprio tecido tumoral (Corrales et al., 2012; Guidi et al., 1988; Pio et al., 2014). A ativação das proteínas de complemento ocorre segundo uma das três vias de sinalização principais: clássica, alternativa e a via das lectinas. Estas proteínas ativadas intervêm na opsonização e na lise celular mediada pelo complexo de ataque de membrana, além de atuarem como substâncias quimiotáticas (Wills-Karp, 2007).

Durante o desenvolvimento neoplásico ocorre remodelação tecidual, o que induz a produção de moléculas pro-inflamatórias. Estas moléculas em conjunto com as quimiocinas produzidas pelas células neoplásicas, promovem o recrutamento de células do sistema imunitário inato – células NKT, células T $\gamma\delta$, NK, macrófagos e células inflamatórias (ex., neutrófilos, mastócitos, basófilos e eosinófilos) (Benlagha & Bendelac, 2000; Pandya et al., 2016; Vicari & Caux, 2002).

O complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC-I) é uma proteína de superfície expressa em todas as células nucleadas (Pandya et al., 2016). As células NK, uma das populações celulares da resposta imunitária inata, induzem a apoptose de células que expressam à sua superfície formas alteradas dessa proteína (Sun & Lanier, 2009). De fato, durante o processo neoplásico pode ocorrer a alteração ou a diminuição da expressão de MHC-I à superfície das células neoplásicas. Essa modificação genética desencadeia a ativação das células NK, através da interação dos seus recetores “natural-killer group 2, member D” (NKG2D) com as glicoproteínas tumorais MICA/B, entre outros ligandos NKG2D conhecidos (Bahram, Inoko, Shiina, & Radosavljevic, 2005; Waldhauer & Steinle, 2008). Os ligandos NKG2D, estruturalmente semelhantes às moléculas MHC-I, são expressos nas células neoplásicas e nas infetadas por vírus (Zhang, Basher, & Wu, 2015). A ativação das células NK induz a apoptose das células neoplásicas através de vários mecanismos: (1) a estimulação mediada pelo TNF- α induz a libertação dos seus grânulos citoplasmáticos, responsáveis pela formação de poros na membrana celular da célula alvo (Lieberman, 2003); (2) resposta ADCC (citotoxicidade celular mediada por anticorpos), desencadeada pela ligação de anticorpos ao recetor Fc das células NK (Lanier, Le, Phillips, Warner, & Babcock, 1983); (3) libertação de citoquinas (ex., IFN- γ) (Waldhauer & Steinle, 2008) que intervêm na ativação e maturação das células apresentadoras de antígenos (APC) – linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, além de sinalizar estas células no sentido de produzirem uma resposta anti-tumoral CD8⁺ (citotóxica) (Mocikat et al., 2003).

Durante o processo neoplásico, os neutrófilos podem exercer funções anti-tumorais e pro-tumorais, ao exercerem funções nas respostas imunitária inata e inflamatória, respetivamente (Galdiero, Marone, & Mantovani, 2017). Estas células possuem fagolisossomas que aprisionam no seu interior várias enzimas, nomeadamente a NADPH oxidase, a superóxido dismutase e a mieloperoxidase (Güngör et al., 2010). A enzima NADPH oxidase intervém na oxidação dos radicais de superóxido e outros radicais livres de oxigénio (RLO) (Gregory & Houghton, 2011). Os RLO exercem efeitos citotóxicos sobre as células neoplásicas, ao induzir a rutura direta das membranas celulares e, promovendo, por isso, a regressão tumoral (Dallegrì et al., 1991; Gregory & Houghton, 2011).

Os macrófagos podem exercer, igualmente, funções anti-tumorais e pro-tumorais no decorrer do processo neoplásico. A ativação das suas funções anti-tumorais decorre da

Os antígenos tumorais libertados durante estes processos citolíticos ficam disponíveis no microambiente tumoral, proporcionando o desenvolvimento da resposta imunitária adquirida (Dunn, Old, & Schreiber, 2004).

O diagrama ilustra as interações entre células tumorais e células do sistema imunológico. O tumor centralizado libera células neoplásicas necrosadas, que apresentam antígenos tumorais. As células T CD4/CD8 ativadas interagem com as células dendríticas, que por sua vez apresentam antígenos tumorais às células T CD8+ ativadas. Os neutrófilos liberam NO, H₂O₂, elastase e ADCC contra o tumor. Os macrófagos M1 produzem IL-12, que ativa as células Th1 CD4+. As células Treg produzem IL-10, que inibe as células Th1 CD4+. As células NK liberam granzima B/perforina contra as células neoplásicas necrosadas. As células T CD8+ ativadas também liberam granzima B/perforina contra as células neoplásicas necrosadas.

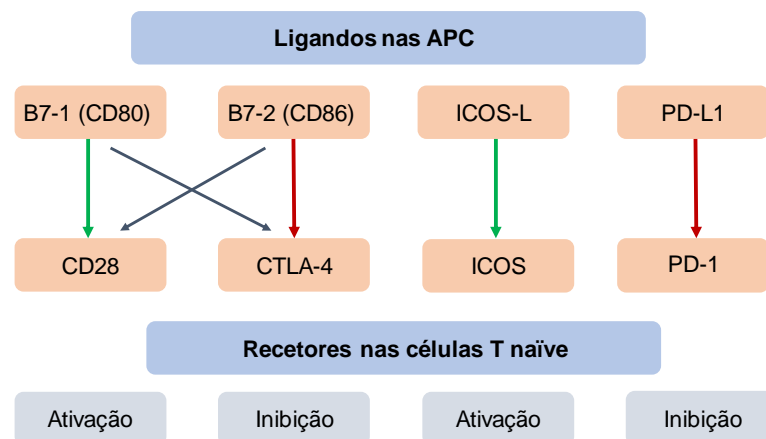
4.2 Resposta imunitária adquirida

As células dendríticas imaturas, recrutadas ao microambiente tumoral, são ativadas em resposta às citocinas produzidas na resposta imunitária inata ou da interação com as células NK vizinhas (Gerosa et al., 2002). Os antígenos produzidos no decorrer da oncogénese, são fagocitados pelas células APC ou sofrem pinocitose pelas células dendríticas, para que decorra a apresentação antigénica (Chen & Mellman, 2013; Pandya et al., 2016). As células dendríticas ativadas migram para os linfonodos regionais, onde induzem a ativação de células T CD4+ e T CD8+ *naïve* específicas do tumor (Huang et al., 1994; Pandya et al., 2016). Os antígenos tumorais processados no interior das células APC

são apresentados, segundo o contexto MHC-I e MHC-II, às células T CD8+ e CD4+, respetivamente (Boon, Cerottini, Van den Eynde, Van der Bruggen, & Van Pel, 1994; Chen & Mellman, 2013). A apresentação antigénica às células T CD8+, segundo o contexto MHC-I, denomina-se de apresentação antigénica cruzada (Schoenberger, Toes, Van der Voort, Offringa, & Melief, 1998). O complexo MHC-II apresenta péptidos exógenos/extracelulares, enquanto que o MHC-I apresenta péptidos endógenos/intracelulares (Bonilla & Oettgen, 2010; Warrington, Watson, Kim, & Antonetti, 2011). Como resultado da apresentação antigénica, para além da produção de células T (CD4+ e CD8+) efetoras, ocorre, igualmente, a produção de células T de memória (Pandya et al., 2016).

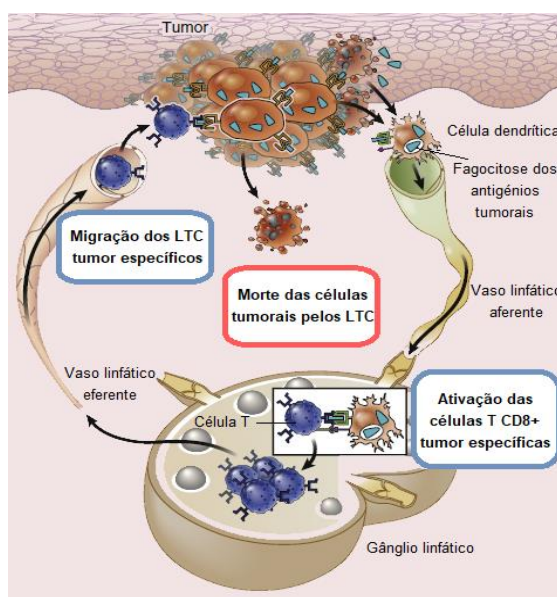
A apresentação antigénica, entre as células APC e as células T CD4+ naïve, compreende a ocorrência de duas vias de sinalização: (1) a interação entre o complexo antígeno/MHC-II e o TCR e, (2) a interação entre moléculas co-estimuladoras [ex., CD28, ICOS, CD80(B7-1) e CD86(B7-2)] (Pandya et al., 2016; Sharpe, 2009). Na figura 6 estão representadas as diferentes moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras, as interações que se estabelecem entre as células T naïve e as APC, bem como o resultado dessa interação.

Figura 6: Sinais de co-estimulação e co-inibição estabelecidos entre as células T naïve e as células APC (adaptado de Abbas et al., 2016).



A ativação das células B naïve pode, igualmente, resultar da sua interação com as células T CD4+ ativadas. Esta interação celular compreende, igualmente, duas vias de sinalização: (1) a interação entre o complexo antígeno tumoral/MHC-II e o TCR e, (2) a interação entre moléculas co-estimuladoras (CD40 recetor/CD40L) (Janeway, Schlomchik, Walport, & Travers, 2011). Após a sua ativação, inicia-se a produção de anticorpos dirigidos aos antígenos tumorais. Como consequência da interação antígeno tumoral/anticorpo, a lise das células neoplásicas pode ser desencadeada através de dois mecanismos diferentes: (1) resposta do tipo ADCC ou CDC (Pandya et al., 2016; Schroeder et al., 2010) e, (2) a ligação dos anticorpos aos recetores Fc das células NK (Pandya et al., 2016). Contudo, os anticorpos produzidos não são eficientes na destruição neoplásica, sobretudo em neoplasias sólidas (Tizard, 2012).

Figura 7: Apresentação antigénica dos antígenos tumorais nos gânglios linfáticos regionais (adaptado de Abbas et al., 2016).



Legenda: LTC, linfócitos T citotóxicos.

Após a apresentação antigénica, as células T CD4+ e CD8+ específicas do tumor são recrutadas para o microambiente tumoral, onde participam na destruição das células neoplásicas. As células T CD8+ induzem, direta ou indiretamente, a morte das células neoplásicas através da produção do IFN- γ e da ativação dos mecanismos dependentes no IFN- γ (Dunn, Old, & Schreiber, 2004). A interação do seu recetor TCR com o complexo antígeno/MHC-I, presente na superfície das células alvo, resulta na libertação de enzimas (ex., perforina e granzima B) pela célula T CD8+ e, consequentemente, na destruição da célula neoplásica (Pandya et al., 2016).

4.3 Ligação entre as imunidades inata e adquirida

A ligação entre as respostas imunitárias inata e adquirida é levada a cabo pelo sistema de complemento, pelas células T γ/δ , NKT, NK, macrófagos e células dendríticas [figura 4].

O sistema de complemento é capaz de erradicar as células neoplásicas, através do complexo de ataque de membrana (resposta do tipo CDC da imunidade inata) (Dunkelberger & Song, 2010; Janeway et al., 2001; Pandya et al., 2016), contribuindo, igualmente, na ativação das células B e T (imunidade adquirida) (Dunkelberger & Song, 2010).

A IL-12, libertada pelas células APC ativadas, desencadeia a ativação das células NK (imunidade inata) (Carraud et al., 1999) e das T CD8+ (imunidade adquirida), promovendo, deste modo, a lise das células neoplásicas e a regressão tumoral (Terabe & Berzofsky, 2008).

As células NKT, através da libertação de IFN- γ , ativam as células NK (imunidade inata) e as T CD8+ (imunidade adquirida), desencadeando, assim, uma resposta anti-tumoral. As células NKT são uma subpopulação de células T, similares às células NK da imunidade inata (Terabe & Berzofsky, 2008), possuindo, por isso, características de ambos os tipos celulares. Estas células contribuem, deste modo, na ligação dos dois tipos de resposta imunitária (Ballas & Rasmussen, 1990; Sykes, 1990).

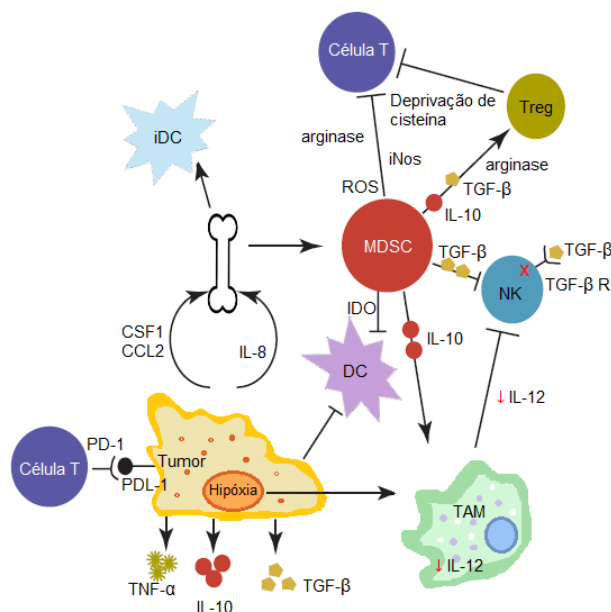
As células T $\gamma\delta$ são capazes de (1) promover a lise tumoral pela secreção de perforinas, após o reconhecimento das glicoproteínas tumorais MICA/B (Gogoi & Chiplunkar, 2013; Groh et al., 1999), (2) ativar as células NK e T CD8+, através da libertação de IFN- γ (Pandya et al., 2016), (3) reconhecer os antigénios tumorais através dos seus recetores Fc e desencadear uma resposta imunitária ADCC (Chen & Freedman, 2008) e, (4) ligarem-se, através dos seus recetores membranares, às proteínas de choque térmico, cuja expressão se encontra elevada no microambiente tumoral (Gogoi & Chiplunkar, 2013; Urban, Chapoval, & Pauza, 2010).

5 Evasão tumoral

Algumas das células neoplásicas são capazes de escapar ao sistema imunitário, mesmo em indivíduos imunocompetentes (Dunn et al., 2004; Rabinovich, Gabrilovich, & Sotomayor, 2007). Os mecanismos de evasão tumoral constituem um desafio ao desenvolvimento de uma imunoterapia eficaz (Guth & Dow, 2012).

A evasão ao sistema imunitário pode ser alcançada através de vários mecanismos [figura 8]: (1) imunossupressão mediada pelas células supressoras de origem mielóide (MDSC), (2) indução das células Treg, (3) comprometimento da função e ativação das células dendríticas, (4) produção de citocinas imunossupressoras e, (5) não reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imunitário (Guth & Dow, 2012).

Figura 8: Mecanismos de evasão tumoral (adaptado de Guth & Dow, 2012).



Legenda: CCL2, quimiocina ligando 2; CSF1, fator de estimulação de colónias 1; DC, célula dendrítica; iDC, célula dendrítica imatura; IDO, indoleamine 2,3-dioxigenase; iNOS, monóxido de azoto sintase; PD-1, proteína de morte celular programada 1; PDL-1, ligando do recetor PD-1; TAM, macrófago associado ao tumor; TGF- β , fator de crescimento transformante beta; TGF- β R, recetor do TGF- β ; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; ↓, diminuição.

5.1 Imunossupressão mediada por células supressoras de origem mielóide (MDSC)

As células MDSC são representadas pelos monócitos imaturos e granulócitos. Em situação de doença, estas células são libertadas da medula óssea para a corrente sanguínea. Por vezes, os macrófagos associados ao tumor (TAM) são incluídos nesta descrição funcional, por apresentarem funções e utilizarem mecanismos em tudo semelhantes aos observados nas células MDSC (Guth & Dow, 2012).

Em condições de hipóxia tumoral, as substâncias quimiotáticas produzidas promovem o recrutamento destas células para o microambiente tumoral. No local, as MDSC suprimem a resposta anti-tumoral local, além de promoverem a invasão e a metastização tumorais, como consequência da produção de metaloproteases e quimiocinas (Bosco et al., 2008; Murdoch, Muthana, Coffelt, & Lewis, 2008; Ye, Yu, & Bian, 2010).

Para além disso, as MDSC são capazes de inibir as células T (pela produção de monóxido de azoto [NO], RLO e arginase), as NK e as dendríticas (Bronte, Serafini, Mazzoni, Segal, & Zanovello, 2003; Guth & Dow, 2012; Kusmartsev, Nefedova, Yoder, & Gabrilovich, 2004).

As MDSC expressam níveis elevados das citocinas TGF- β e IL-10, ambas capazes de estimular a função das células Treg e dos TAM. Além disso, estas células diminuem a produção de IL-12 pelos TAM, uma citocina importante na ativação e proliferação das células T (Huang et al., 2006; Ostrand-Rosenberg, Sinha, Beury, & Clements, 2012). A anergia que induzem nas células NK resulta da diminuição da produção de IL-12 e da interação direta (por contacto) com a citocina TGF- β expressa pelas MDSC (Ostrand-Rosenberg et al., 2012).

5.2 Indução das células Treg

Há vários mecanismos pelos quais as células Treg se encontram elevadas no microambiente tumoral: (1) conversão das células T CD4⁺ em Treg, mediada pelas células dendríticas ou pela sensibilização mediada pelo TGF- β (Chen & Mellman, 2013; Hawiger, Wan, Eynon, & Flavell, 2010), (2) proliferação de células Treg específicas do tumor e, (3) recrutamento de células Treg, mediado pela libertação de quimiocinas (ex., CCL22) (Guth & Dow, 2012).

Estas células produzem citocinas imunossupressoras, nomeadamente a IL-10, o TGF- β e a IL-35 (Li, Li, Tsun, & Li, 2015), sendo capazes de suprimir as células T CD4⁺, CD8⁺ e NK (Guth & Dow, 2012).

5.3 Comprometimento da função e da ativação das células dendríticas

As células dendríticas podem ter a sua função e ativação comprometidas pela contribuição de vários fatores. Por outro lado, as células dendríticas associadas aos tumores tendem a ser imaturas e não funcionais. Com efeito, a presença de tais células diminui a apresentação antigénica e a estimulação das células T, privilegiando-se assim, os fenómenos de tolerância imunitária (Guth & Dow, 2012; Pinzon-Charry et al., 2005).

Assim, durante o desenvolvimento neoplásico, vários são os fatores que interferem na função e maturação das células dendríticas associadas ao tumor, enumerando-se (1) a sobreexpressão da proteína S100A9, (2) a acumulação de triglicéridos nessas células, (3) a subexpressão de moléculas de superfície (ex., MHC-II) (Guth & Dow, 2012; Herber et al., 2010; Liu et al., 2008) e, (4) a secreção das citocinas IL-10 e VEGF (Gabrilovich et al., 1996; Guth & Dow, 2012).

Pinzon-Charry et al. (2005) demonstraram, ainda, que a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no microambiente tumoral induz a apoptose das células dendríticas.

5.4 Produção de citocinas imunossupressoras

As citocinas de maior importância nos mecanismos de evasão tumoral são a IL-10, o TGF- β e o TNF- α . Estas citocinas suprimem a resposta T anti-tumoral e a função das células dendríticas (Guth & Dow, 2012; Lin & Karin, 2007). Na tabela 4 estão representadas as principais funções destas citocinas imunossupressoras no contexto da evasão tumoral.

Tabela 4: As funções das citocinas imunossupressoras no contexto da evasão tumoral.

| | | Funções |
|-----------------------------|---------------|---|
| Citocinas imunossupressoras | IL-10 | <ul style="list-style-type: none">• Promove a função e a proliferação de Treg;• Promove a progressão tumoral (efeitos autócrinos e parácrinos nas células neoplásicas)(Guth & Dow, 2012; Sredni et al., 2004);• Inibição da produção de citocinas pelas Th1 e IL-12 pelos TAM (Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2008; Sica et al., 2000); |
| | TGF- β | <ul style="list-style-type: none">• Promove a função e a proliferação de Treg;• Promove progressão tumoral: inibição da resposta T CD8+, estimulação da invasão e metastização tumorais (Guth & Dow, 2012; Sredni et al., 2004);• Inibe a ativação dos macrófagos e a proliferação de células B (Guth & Dow, 2012); |
| | TNF- α | <ul style="list-style-type: none">• Induz a síntese de proteínas anti-apoptóticas;• Induz a angiogénese e a metastização tumorais;• Dificulta as respostas T CD8+ e macrofágica (Guth & Dow, 2012; Luo, |



5.5 Não reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imunitário

As células neoplásicas são capazes de diminuir a expressão das moléculas de superfície MHC, de modo a escaparem ao reconhecimento efetuado pelas células T. A ausência destas moléculas pode dever-se a (1) alterações na estrutura e síntese proteicas, (2) perda de alelos ou (3) defeitos no processamento e apresentação de antígenos (Bubeník, 2003; Garrido, Algarra, & García-Lora, 2010; Guth & Dow, 2012).

As células neoplásicas são ainda capazes de expressar moléculas co-inibidoras, nomeadamente a CD73 e/ou PD-L1 (Guth & Dow, 2012). A expressão de CD73 gera um microambiente tumoral rico em adenosina, um substrato com propriedades imunossupressoras (Jin et al., 2010). Por outro lado, a expressão de PD-L1 diminui a resposta T anti-tumoral (Carter et al., 2002) e a atividade das células NK (Benson et al., 2010).

6 Immunoterapia anti-tumoral

O principal objetivo da imunoterapia oncológica é direcionar ou amplificar a resposta imunitária anti-tumoral. Para que possam ser considerados alvos potenciais na imunoterapia, os antígenos tumorais necessitam de ser reconhecidos pelo sistema imunitário. Além disso, os antígenos ideais são aqueles que apresentam maior imunogenicidade e, cuja expressão ocorra exclusivamente nas células neoplásicas (Kelly et al., 2018). A imunoterapia pode ser não específica, ativa ou passiva, de acordo com as substâncias ativas utilizadas e os seus respetivos mecanismos de ação (Tizard, 2012).

A imunoterapia para ser considerada ideal tem de conseguir produzir uma distinção das células normais das neoplásicas (especificidade), ser suficientemente robusta para eliminar uma população celular independentemente da sua dimensão (sensibilidade) e, prevenir o reaparecimento da doença oncológica (durabilidade) (Bergman, 2017).

O conhecimento do funcionamento e da regulação do sistema imunitário possibilitou o desenvolvimento de imunoterapias mais eficazes. Além disso, é exequível a utilização da imunoterapia em associação com outras modalidades terapêuticas, nomeadamente, a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia e outras terapias anti-neoplásicas. Assim, a utilização conjunta destas modalidades terapêuticas pode aumentar a eficácia do tratamento oncológico (Guth & Dow, 2012).

6.1 Immunoterapia não específica

A eliminação tumoral não específica é mediada pela resposta imunitária inata, sendo por isso, independente das células T (Regan, Guth, Coy, & Dow, 2016). As suas estratégias subdividem-se em dois grandes grupos: os modificadores de resposta biológica e as citocinas recombinantes (Bergman, 2017).

Algumas das estratégias utilizadas compreendem a administração de substâncias ativas dirigidas aos recetores de reconhecimento de padrões (ex., *Toll-like receptors* [TLR] e *Nod-*

like receptors [NLR]). As células efetoras envolvidas neste tipo de imunoterapia compreendem as células NK, os monócitos e os macrófagos ativados. A lise direta das células neoplásicas e os efeitos dependentes do IFN- γ , processos mediados pelas células NK, são responsáveis pela eliminação das células neoplásicas. Como esta modalidade terapêutica não promove a memória imunitária, é necessária a administração frequente da substância ativa (ex., semanalmente) para a obtenção dos resultados desejáveis. Contrariamente, as estratégias de imunoterapia específica são mediadas por células T efetoras e de memória, sobretudo as células T CD8⁺ (Regan et al., 2016).

Em Medicina Veterinária, a imunoterapia não específica tem revelado uma eficácia contraditória, variando consoante a substância ativa utilizada e a neoplasia a tratar. A título de exemplo, a administração de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), sozinha ou combinada com outras terapias, a cães com carcinoma das células de transição, carcinoma mamário, osteossarcoma e linfoma, não demonstrou benefício clínico (Biller, 2017; Knapp et al., 2000; Parodi et al., 1983). Por outro lado, a administração de IL-12 em cães com melanoma demonstrou eficácia, pela obtenção de taxas de resposta superiores a 50% (Paoloni et al., 2015).

Contudo, a estimulação de uma resposta imunitária não específica e não dirigida às células neoplásicas, faz com que a utilização da imunoterapia não específica esteja associada a efeitos secundários significativos, principalmente quando são administradas citocinas recombinantes (Bergman, 2017; Guth & Dow, 2012; Regan et al., 2016; Tizard, 2012).

6.1.1 Modificadores de resposta biológica

Os modificadores de resposta biológica são capazes de modificar essa resposta, quando as células estão sujeitas a alterações no seu ambiente externo. Os microrganismos BCG, *Salmonella typhimurium*, vírus oncolíticos, os superantigénios e o “imiquimod” (agonista do TLR7), são exemplos de modificadores de resposta biológica (Bergman, 2017; Tizard, 2012).

6.1.2 Citoquinas recombinantes

A ativação das células NK pode ser estimulada pela administração de citocinas recombinantes, nomeadamente o IFN- α , o IFN- γ , o IFN- ω , a IL-12, a IL-2 e a IL-15 (Bergman, 2017; Regan et al., 2016).

A administração de IL-12 em animais com tumor venéreo transmissível, mastocitoma e sarcoma felino demonstrou eficácia terapêutica, por atrasar a progressão e o crescimento tumorais, além de reduzir significativamente as dimensões do tumor (Chuang et al., 2009; Pavlin et al., 2011; Siddiqui et al., 2007).

A administração da IL-2 (Oncept[®] IL-2), como terapia adjuvante, em gatos com fibrossarcoma no estágio I da doença demonstrou, igualmente, eficácia terapêutica, por reduzir o risco de recidiva e aumentar o tempo até à recidiva da doença (Jas et al., 2014).

6.2 Imunoterapia ativa

A imunoterapia ativa envolve a exposição do indivíduo aos antígenos tumorais, de modo a produzir uma resposta imunitária eficaz face aos mesmos (Kelly et al., 2018). Esta imunoterapia é representada, em grande parte, pelas vacinas anti-tumorais (Regan et al., 2016), as quais são capazes de induzir uma resposta imunitária específica (celular e humoral) e, não específica, ambas relevantes na rejeição tumoral (Ciocca, Cayado-Gutierrez, Maccioni, & Cuello-Carrion, 2012).

Uma vacina anti-tumoral é considerada eficaz se alcançar a estimulação das células APC e, se desencadear uma resposta imunitária mediada pelas células T CD4+ e T CD8+ (Kumaraguru, Suvas, Biswas, Azkur, & Rouse, 2004). Nessas vacinas, o tempo de resposta compreende semanas a meses, devido à indução lenta das células T efectoras e de memória [tabela 5] (Bergman, 2017; Regan et al., 2016). O tempo de resposta e a carência de meios objetivos que visam a mensuração da eficácia terapêutica, dificultam o desenvolvimento destas vacinas (Guth & Dow, 2012). Por outro lado, a produção de células de memória estabelece uma imunidade anti-tumoral duradoura, reduzindo, eventualmente, a probabilidade de recorrência da doença (Palomba, 2012).

As vacinas anti-tumorais são classificadas quanto à sua natureza, podendo englobar péptidos/proteínas, material genético e células inteiras ou lisados celulares.

Tabela 5: Comparação da quimioterapia relativamente às imunoterapias anti-tumorais (adaptado de Bergman, 2017).

| Tratamento | Mecanismo de ação | Especificidade | Sensibilidade | Tempo de resposta | Duração da resposta |
|------------------------|---------------------|----------------|---------------|-------------------|---------------------|
| Quimioterapia | Citotoxicidade | Baixa | Variável | Horas a dias | Variável |
| Vacina anti-tumoral | Resposta imunitária | Elevada | Boa | Semanas a meses | Variável a longa |
| Anticorpos monoclonais | Resposta imunitária | Elevada | Boa | Semanas | Variável |

6.2.1 Vacinas anti-tumorais: indicações e perspectivas futuras

As estratégias mencionadas anteriormente, assumem um interesse especial nas situações onde a cirurgia ou a radioterapia são ineficientes, pela localização ou metastização tumorais. Além disso, a administração da imunoterapia ativa é plausível nas neoplasias tratadas cirurgicamente ou com radioterapia e num estágio inicial da doença. Nesta ocasião, o que

se pretende é a eliminação da doença residual mínima e a prevenção da sua recorrência (Kelly et al., 2018).

As imunoterapias adjuvantes devem ser utilizadas após a citoredução tumoral (ex., após cirurgia), quando a carga tumoral, as células imunossupressoras (ex., células Treg) e os vários mediadores inflamatórios (ex., TGF- β , IL-10) estão diminuídos. Além disso, a utilização das vacinas anti-tumorais está direcionada para os doentes com pior prognóstico, ou seja, com doença residual mínima ou micrometástases (Ciocca et al., 2012).

As neoplasias são capazes de produzir um microambiente tumoral imunossupressor, através de vários mecanismos, por isso, a utilização da imunoterapia ativa, cujo princípio se baseia na estimulação do sistema imunitário, pode revelar-se inútil perante esse microambiente. Contudo, a imunossupressão tumoral pode ser ultrapassada através do desenvolvimento de novas estratégias e da combinação de terapêuticas anti-neoplásicas (Guth & Dow, 2012). O doente, no qual se realiza a imunoterapia anti-tumoral, pode estar imunodeprimido, como consequência da administração prévia de fármacos citotóxicos, resultando por isso, uma apresentação ineficiente dos antígenos tumorais, capaz de favorecer não só a evasão tumoral, mas também conduzir à imunotolerância (Hollander, 2012; Walter, Biller, Lana, Bachand, & Dow, 2006)

Portanto, de modo a promover uma resposta imunitária anti-tumoral eficaz é necessário aumentar a imunogenicidade antigénica, otimizar o transporte e a apresentação dos antígenos tumorais, e além disso, modelar o sistema imunitário do indivíduo com o objetivo de contrariar a imunossupressão tumoral (Marconato et al., 2014).

6.2.2 Vacinas com péptidos/proteínas

As vacinas que englobam péptidos/proteínas não são bem-sucedidas no desenvolvimento da resposta imunitária citotóxica. Este tipo de vacina desencadeia maioritariamente uma resposta imunitária do tipo Th2. Os péptidos/proteínas, por apresentarem uma localização extracelular, são apresentados às células T *helper* segundo o contexto MHC-II. A resposta imunitária anti-tumoral produzida não é eficiente nem robusta, em grande parte pela incapacidade de estimular as células T CD8+. Portanto, de modo a potenciar as propriedades imunoestimulantes dessas vacinas, os péptidos/proteínas são conjugados com vários tipos de adjuvantes vacinais (Kelly et al., 2018; Zahm, Colluru, & McNeel, 2017).

6.2.3 Vacinas genéticas

Nas vacinas genéticas recorre-se à administração de mRNA ou sequências codificantes, diretamente no indivíduo. Nas vacinas que incorporam sequências codificantes, a informação genética é transportada num vetor, habitualmente um plasmídeo bacteriano (Kelly et al., 2018; Zahm et al., 2017), mas os vetores virais podem ser igualmente utilizados (Larocca & Schlom, 2011). O princípio dessas vacinas assenta no processamento local dos

antígenos tumorais pelas células APC, na síntese/expressão dos antígenos e na sua apresentação às células T *naïve* (Pol et al., 2014).

Após a administração, normalmente por via intradérmica ou intramuscular, as proteínas expressas pelo plasmídeo são processadas pelas células dendríticas e apresentadas segundo o contexto MHC-I e MHC-II (Guth & Dow, 2012). A apresentação antígenoica segundo o contexto MHC-I promove a ativação de células T CD8+, sendo o desejável na imunoterapia anti-tumoral (Blum, Wearsch, & Cresswell, 2013).

As vacinas genéticas que incorporam vetores bacterianos apresentam como principal vantagem a estimulação da resposta imunitária inata, como consequência da ativação do TLR-9 pelo ADN bacteriano presente nas vacinas. Além disso, a existência dos motivos CpG, frequentemente encontrados nos plasmídeos bacterianos, providencia a estimulação das células dendríticas, sinalizando-as para a estimulação de uma resposta imunitária Th1 (Kobiyama et al., 2013; Mutwiri et al., 2003).

A imunogenicidade destas vacinas tem sido aprimorada através da introdução de promotores ou outros adjuvantes vacinais, nomeadamente citoquinas e outras moléculas ativadoras da resposta imunitária inata (Saade & Petrovsky, 2012).

6.2.4 Vacinas celulares

Nas estratégias terapêuticas oncológicas inclui-se também a administração de APC autólogas e ativadoras do sistema imunitário, desencadeando a apresentação de péptidos/antígenos às células T segundo o contexto MHC-I ou MHC-II; ou a utilização das células neoplásicas inteiras, autólogas ou heterólogas tratadas com radiação. A manipulação *ex vivo* das células que constituem a vacina, visa incrementar e otimizar a sua imunogenicidade (Guth & Dow, 2012; Kelly et al., 2018).

A utilização de vacinas com células inteiras providencia a estimulação das respostas imunitárias inata e adquirida. Contrariamente às vacinas celulares não purificadas, as que incorporam antígenos celulares específicos purificados, podem, porventura, potenciar a imunoedição tumoral e o sobrecrecimento de células neoplásicas negativas ao antígeno vacinal (Guth & Dow, 2012; Kelly et al., 2018).

Alguns estudos, em cães com melanoma, linfoma e hemangiossarcoma, demonstraram a ausência de eficácia terapêutica das vacinas celulares (autólogas ou alogénicas), pela ausência de melhorias, significativas, no tempo de sobrevivência dos animais vacinados (Hogge et al., 1999; Kelly et al., 2018; U'Ren, Biller, Elmslie, Thamm, & Dow, 2007).

6.3 Imunoterapia passiva

As estratégias de imunoterapia passiva incluem a transferência de linfócitos autólogos ativados *ex vivo* (transferência adotiva de células) ou a administração de anticorpos (Bergman, 2017; Kelly et al., 2018).

6.3.1 Transferência adotiva de células

A transferência adotiva de células consiste na transferência de células efetoras, com o intuito de gerar uma resposta imunitária anti-tumoral robusta e específica. Nesta abordagem terapêutica, as células são recolhidas do doente, ativadas e expandidas num meio de cultura apropriado, sendo, posteriormente, transferidas para o doente dador. Por se tratar de uma técnica laboriosa e dispendiosa, a sua utilização em Medicina Veterinária é limitada (Bergman, 2017; Guth & Dow, 2012).

6.3.2 Anticorpos monoclonais

Apesar de não haver produção de anticorpos para uso veterinário, estudos piloto com anticorpos caninizados anti-CD20 e CD-52 demonstraram resultados promissores no tratamento do linfoma canino de células B e T, respetivamente, embora os estudos não revelarem melhorias na progressão clínica dos doentes. Outro estudo piloto em linfoma e plasmocitoma caninos, demonstrou que a administração de anticorpos monoclonais humanizados (L243 e IMMU-114) conduzia a efeitos secundários dose-dependentes, nomeadamente mielosupressão. Com efeito, é necessária uma maior investigação, no que diz respeito à eficácia e segurança decorrente da utilização de anticorpos monoclonais no tratamento do linfoma em cães (Bergman, 2017; Regan et al., 2016; Stein et al., 2011).

7 Vacinas anti-tumorais baseadas nas proteínas de choque térmico

A imunoterapia anti-tumoral apresenta como principal objetivo a reversão da tolerância imunitária perante as células neoplásicas. As vacinas anti-tumorais baseadas nas proteínas de choque térmico (HSP) são desenvolvidas com o intuito de estimular a resposta imunitária celular. Para tal, as proteínas alteradas e sintetizadas pelas células neoplásicas são purificadas e, associadas a um vetor. Esta técnica permite o desenvolvimento de vacinas autólogas que tornam os antígenos tumorais visíveis perante o sistema imunitário (Urodelia, 2017).

7.1 Proteínas de choque térmico (HSPs)

7.1.1 Funções das proteínas de choque térmico

As HSPs são uma das famílias de proteínas mais abundantes no interior da célula, sendo *chaperones* moleculares ATP-dependentes, expressas durante o crescimento celular normal (HSPs constitutivas). Estas proteínas desempenham funções importantes no (1) enrolamento de proteínas celulares, (2) transporte de proteínas no citosol, retículo endoplasmático e mitocôndrias, (3) reparação e degradação de proteínas alteradas, (4) enrolamento de proteínas com má conformação (Hendrick & Hartl, 1993) e, por último, (5) regulação das vias de transdução de sinais (Kelly et al., 2018).

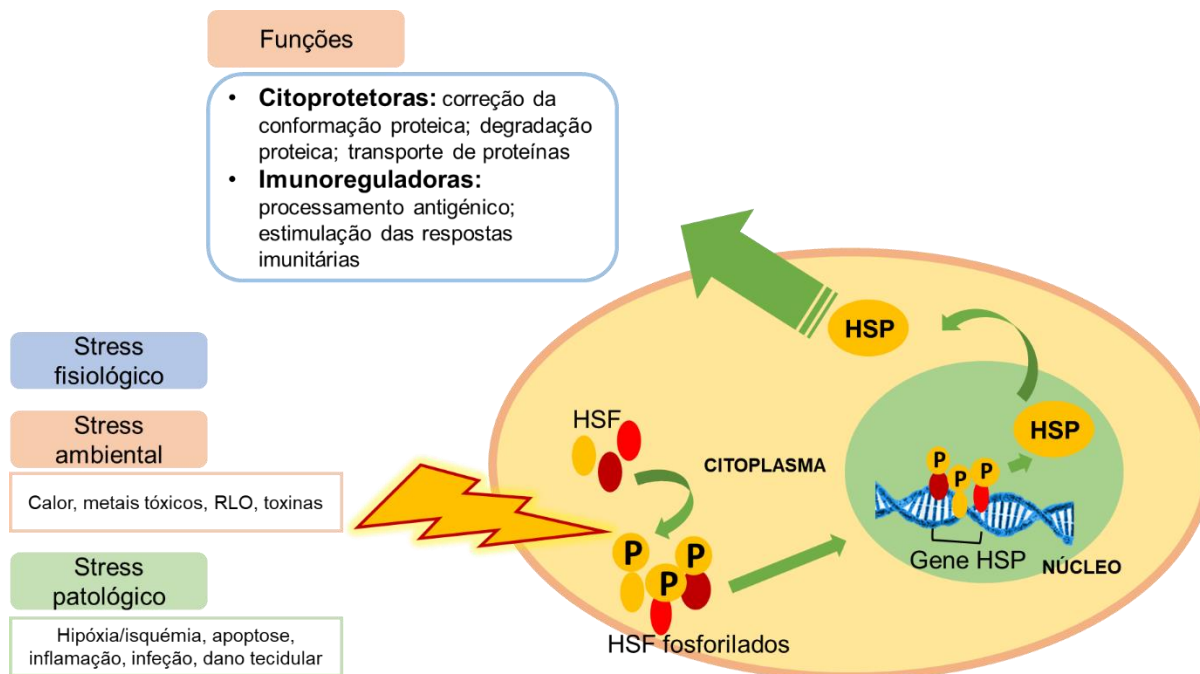
Por outro lado, a expressão das HSPs é, igualmente, induzida (HSPs indutivas) perante várias situações de stress fisiológico, ambiental ou patológico, nomeadamente privação de nutrientes, stress oxidativo, hipóxia, isquémia, estímulos apoptóticos e lesões neuronais

[figura 9]. Para além de desempenharem funções citoprotetoras e imunoreguladoras, e dependendo da pressão inicial, a síntese destas proteínas gera tolerância celular (Dubey et al., 2015; Hendrick & Hartl, 1993; Pathan, Latif, Das, Siddiquee, & Khan, 2010).

No âmbito da imunologia, as HSPs desempenham funções importantes no processamento antigénico, pois auxiliam a captação antigénica via endocitose mediada por recetores (Arnold-Schild et al., 1999). Estas proteínas ligam-se a péptidos *self*, *non-self* ou a derivados de antígenos celulares através de interações hidrofóbicas (Li, Menoret, & Srivastava, 2002; Parsell, 1993). A sua capacidade de ligação a outras moléculas envolve a cooperação do terminal-N ATPase e o terminal-C, representando este último, o domínio de ligação aos péptidos. Portanto, a ligação HSP/péptido é dependente da hidrólise de ATP (Kelly et al., 2018).

As HSPs sofrem translocação do meio intracelular para o meio extracelular através de mecanismos ainda não compreendidos, mas a sua localização extracelular desempenha funções importantes na estimulação das respostas imunitárias inata e adquirida (Ciocca et al., 2012). As funções imunitárias desempenhadas pelas HSPs torna-as pois um excelente alvo terapêutico no tratamento de neoplasias (Schmitt, Gehrmann, Brunet, Multhoff, & Garrido, 2006).

Figura 9: Regulação e funções das proteínas de choque térmico, quando induzidas pelo stress fisiológico, ambiental ou patológico (adaptado de Chatterjee & Burns, 2017).



Legenda: RLO, radicais livres de oxigénio; HSF, fatores de transcrição das proteínas de choque térmico; HSP, proteínas de choque térmico; P, fósforo.

7.1.2 O papel das HSP nas neoplasias

As HSPs estão envolvidas em todas as etapas do desenvolvimento neoplásico, nomeadamente na proliferação, inibição da apoptose, angiogénese, invasão e metastização tumorais (Dubey et al., 2015). A expressão de HSPs tem sido investigada em várias neoplasias humanas e caninas, demonstrando valor preditivo no diagnóstico, no prognóstico e na terapêutica (Selvarajah et al., 2013). A sua sobreexpressão tem sido reportada em várias neoplasias caninas, nomeadamente, no carcinoma mamário, tumor venéreo transmissível, epiteloma cutâneo, carcinoma de células escamosas e osteossarcoma (Romanucci et al., 2012; Romanucci, Bastow, & Della Salda, 2008). O mecanismo que conduz à sua sobreexpressão não está convenientemente elucidado, contudo, acredita-se que a produção destas proteínas é induzida pelas características ambientais do tumor, nomeadamente, níveis reduzidos de glucose, pH e oxigénio. Além disso, no desenvolvimento tumoral verifica-se a produção de oncoproteínas mutantes, com conformação alterada, estímulo capaz de promover a produção de HSPs (Ciocca & Calderwood, 2005).

A HSP90, uma das proteínas de choque térmico mais prevalente, interage e estabiliza uma enorme quantidade de proteínas quinases, fatores de transcrição e outras moléculas que intervêm na transformação neoplásica (Ciocca & Calderwood, 2005; Dubey et al., 2015). O conhecimento da estrutura e constituição proteicas, permite o desenvolvimento e a aplicação de fármacos capazes de inibirem as HSPs e, induzirem um efeito anti-neoplásico (Richardson et al., 2011).

As HSPs desempenham funções anti-inflamatórias e imunossupressoras *in vivo*, contribuindo, igualmente nas propriedades imunoreguladoras do microambiente tumoral, através do recrutamento de células MDSC e Treg (Calderwood, Stevenson, & Murshid, 2012).

As HSPs são capazes de estabelecer ligação com os antígenos tumorais (complexo HSP/péptido) e apresentá-los às células APC, segundo o contexto MHC-I e MHC-II, estimulando a produção de células T CD8+ e T CD4+, respetivamente. Estas proteínas estão envolvidas na resposta imunitária anti-tumoral (inata e adquirida), participando na apresentação antigénica, apresentação cruzada, ativação e maturação das células dendríticas, ativação de macrófagos e linfócitos, e, também, na produção de citocinas (Tsan & Gao, 2009). As funções imunitárias do complexo HSP/péptido são atribuídas à associação entre estas duas entidades e, não à HSP em si nem à presença de proteínas contaminantes (Ciocca et al., 2012; Zhang & Zheng, 2013).

7.2 Vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs

O estudo no âmbito das vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs iniciou-se na década de 80 do século passado. Os estudos efetuados em murganhos com neoplasias hepática e fibrossarcoma demonstraram que as HSPs conferiam imunidade protetora, acreditando-se na existência de uma relação entre os antígenos tumorais e essas proteínas (Srivastava, DeLeo, & Old, 1986; Srivastava & Das, 1984).

No sentido de esclarecer a função das HSPs na estimulação da resposta imunitária anti-tumoral, os vários estudos realizados concluíram que estas proteínas, por se tratarem de *chaperones*, complexavam-se com os antígenos tumorais (Srivastava & Maki, 1991) e, que o produto final (complexos HSP/péptido), isolado das células tumorais, constituía a identidade imunogénica capaz de estimular a resposta imunitária específica (Udono & Srivastava, 1994; Zhang & Zheng, 2013). Num desses estudos, Udono e Srivastava (1994) demonstraram, igualmente, a ausência de imunogenicidade nas preparações contendo apenas péptidos livres, não complexados com as HSPs.

Os antígenos tumorais por si só não são capazes de desencadear uma resposta imunitária T celular, a não ser que existam na vacina outras substâncias ativadoras das células APC. Essas substâncias denominam-se adjuvantes vacinais, sendo importantes na expressão de moléculas co-estimuladoras e na produção de citocinas pelas células APC, ambas importantes na ativação da resposta imunitária celular (Abbas et al., 2016).

Nas vacinas constituídas por péptidos, a incorporação de adjuvantes vacinais assume importância na resposta imunitária produzida. Quando incorporados na vacina, os adjuvantes são substâncias capazes de aperfeiçoar o seu desempenho, através de vários mecanismos: (1) facilitam a interação antígeno/APC, (2) estimulam a produção de citocinas ativadoras das respostas imunitárias T CD4+ e T CD8+ e, por último, (3) promovem a produção da resposta imunitária celular. As principais vantagens associadas à sua utilização dizem respeito à sua baixa toxicidade, ao aumento da magnitude, disponibilidade, qualidade e durabilidade da resposta imunitária antígeno-específica, bem como, à diminuição na quantidade de antígenos ou no número de imunizações necessárias para a obtenção da resposta pretendida (Ciocca et al., 2012).

A maioria dos adjuvantes vacinais são produtos de origem microbiana ou substâncias que os mimetizam, interagindo, por isso, com os recetores de reconhecimento de padrões da resposta imunitária inata (ex., TLR e NLR) (Abbas et al., 2016). A natureza dos adjuvantes vacinais é pois variável, constituindo exemplos os sais minerais (ex., hidroxiapatite), as emulsões, as partículas virais, as toxinas bacterianas e as citocinas (Ciocca, Frayssinet & Cuello-Carrión, 2007; Ciocca et al., 2012).

A utilização das nanopartículas de hidroxiapatite facilita a purificação das HSPs. O método utilizado nessa purificação baseia-se na cromatografia de adsorção ou de trocas iónicas, utilizando-se, para o efeito, uma coluna de cromatografia contendo pó cerâmico de

hidroxiapatite com microporosidades. As nanopartículas de hidroxiapatite são biocompatíveis, sendo fagocitadas e degradadas pelas células mononucleares do sistema imunitário. Os íons Ca^{2+} e PO_4^- , presentes na superfície do material, estabelecem interações com as proteínas gp96, uma proteína HSP90, permitindo, assim, o seu isolamento, embora não esteja bem compreendido o seu mecanismo de adsorção (Ciocca et al., 2007; Heughebaert, LeGeros, Gineste, Guilhem, & Bonel, 1988; Simonet et al., 2013). O adjuvante vacinal apresenta carga negativa, pelo que as interações gp96/hidroxiapatite estabelecidas são de natureza eletrostática (Ciocca et al., 2007). As proteínas de choque térmico gp96 e HSP70 apresentam uma afinidade particular pela superfície da hidroxiapatite (Marconato et al., 2014).

A hidroxiapatite, sendo um adjuvante vacinal, aumenta a disponibilidade dos antígenos tumorais perante o sistema imunitário, aumentando, desse modo, a imunogenicidade das vacinas (Simonet et al., 2013). Além de desempenhar o papel de vetor/adjuvante vacinal, a hidroxiapatite (1) desencadeia uma reação de corpo estranho, quando administrada na derme ou no tecido subcutâneo, (2) é fagocitada pelas células APC, (3) transfere as proteínas para o interior das células APC, (4) despoleta um afluxo de células APC e macrófagos no local de administração (Simonet et al., 2013; Ciocca et al., 2007) e, (5) estimula a maturação das células APC (Urodelia, 2017).

Ciocca et al. (2007) foram os primeiros investigadores a administrarem hidroxiapatite por via subcutânea. Com esse ensaio pretendia-se determinar o tempo de degradação da hidroxiapatite, verificar a ocorrência de efeitos secundários ou de uma resposta inflamatória associada à sua administração. Todos os murganhos, aos quais se administrou a hidroxiapatite, toleraram bem a administração, demonstrando apenas alguns efeitos secundários no local de administração, nomeadamente, eritema e resposta inflamatória moderada. No decorrer do ensaio (duração 7 dias), a realização de múltiplas biópsias, no local de administração, evidenciou a degradação das partículas de hidroxiapatite e, a infiltração de células inflamatórias, nomeadamente macrófagos, eosinófilos e leucócitos polimorfonucleares. A imunohistoquímica revelou, ainda, que as células contendo os agregados intracelulares de hidroxiapatite correspondiam a macrófagos CD68+.

Na tabela 6 apresentam-se os efeitos observados secundariamente à administração subcutânea de hidroxiapatite, em murganhos.

Tabela 6: Efeitos da administração de hidroxiapatite por via subcutânea, em murganhos (adaptado de Ciocca et al., 2007).

| Tempo | Características HA | RI | Macrófagos | Eosinófilos | Leucócitos |
|-------------------|------------------------|-----|------------|-------------|------------|
| 30 minutos | Depósitos grandes | + | + | - | - |
| 2 horas | Depósitos grandes | + | + | - | - |
| 6 horas | Grandes e fragmentados | ++ | + | + | + |
| 24 horas | Grandes e fragmentados | ++ | ++ | + | + |
| 2 dias | Grandes e fragmentados | ++ | ++ | ++ | + |
| 4 dias | Grandes e fragmentados | +++ | +++ | ++ | + |
| 7 dias | Ausentes | ++ | + | +++ | + |

Legenda: RI, resposta inflamatória; HA, hidroxiapatite; -, ausente; +, fraco/a; ++, moderado/a; +++, forte.

Simonet et al. (2013) demonstraram que aproximadamente 20000 APC são ativadas, *in vitro*, pela exposição a 500 µL de uma vacina baseada nas HSPs (gp96 e HSP70) e em hidroxiapatite. Concluíram, ainda, que a fagocitose das partículas de hidroxiapatite pelas APC induz a síntese de várias citocinas (ex., IL-6 e TNF- α) necessárias à apresentação cruzada das células T CD8+. Esse estudo demonstrou, igualmente, que a utilização de hidroxiapatite isolada não desencadeia a ativação dos recetores TLR2 e TLR4. Portanto, o seu efeito adjuvante não está, aparentemente, relacionado com a ativação desses recetores, mas parece dever-se à ativação do inflamassoma, um complexo multiproteico responsável pela produção de IL-1 β (Ciocca et al., 2007; Simonet et al., 2013; Urodelia, 2017)

7.2.1 Estudos com vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs

Vários estudos foram realizados em modelos animais com o propósito de descobrir (1) a via de administração, (2) o melhor esquema vacinal, (3) os efeitos secundários produzidos, (4) a produção da resposta imunitária anti-tumoral e, (5) a eficácia clínica das vacinas baseadas nas HSPs (Ciocca et al., 2012).

A vacinação autóloga com HSPs (gp96 e HSP70) em murganhos com carcinoma do pulmão, melanoma, carcinoma de células fusiformes, fibrossarcoma e carcinoma do cólon, demonstrou eficácia terapêutica, por aumentar os tempos de sobrevivência, por produzir uma resposta imunitária anti-tumoral e, por reduzir as dimensões do tumor e das metástases (Tamura, Peng, Liu, Daou, & Srivastava, 1997). Contudo, a sua eficácia demonstrou-se

superior na terapêutica dos animais com doença residual mínima. Por outro lado, em animais com doença metastática avançada, a sua eficácia foi limitada e, nesses casos, apenas uma parte dos animais respondeu à terapêutica (Tamura et al., 1997; Zhang & Zheng, 2013).

A imunogenicidade das HSPs gp96 e HSP70 é superior à verificada na HSP90, o análogo citoplasmático da gp96 (Lammert et al., 1997; Udonon & Srivastava, 1994). Devido à sua localização no retículo endoplasmático, a gp96 está diretamente envolvida na ligação e produção do complexo MHC-I/péptido (Lammert et al., 1997). Essa constatação e a sua abundância no interior da célula, tornaram a gp96 a proteína preferencial no desenvolvimento de vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs (Randazzo et al., 2012).

7.2.1.1 Vacinas anti-tumorais baseadas nas HSPs em Medicina Humana

Em Medicina Humana, as vacinas baseadas nas HSPs (HSP70, HSP65, gp96, HSP90) foram testadas nas neoplasias do cólon, da próstata, do estômago, do pâncreas, do fígado, da tireóide, do pulmão, do ovário, linfoma não-Hodgkin, leucemia, neoplasia mamária, glioma, melanoma e carcinoma renal. Na maioria dos pacientes tratados não foram observadas reações adversas graves nem reações autoimunes. Contudo, num desses estudos, uma pequena proporção dos indivíduos tratados (3/16) manifestou reações sistêmicas (ondas de calor) à vacinação, 30 a 48 minutos após a imunização. As vacinas em questão demonstraram eficácia terapêutica, principalmente no tratamento dos pacientes com melanoma e carcinoma renal, pela ausência de efeitos secundários graves, pela resposta clínica dos pacientes (regressão completa ou parcial) e, pela produção de uma resposta anti-tumoral, evidenciada pelos estudos imunológicos. Noutro estudo, foi demonstrada a produção de uma resposta celular T CD8+ (em 50% [6/12] dos indivíduos imunizados) e, expansão de uma população celular constituída por células NK (em 70% [8/13] dos indivíduos imunizados). A expansão observada nas células NK foi atribuída à libertação de IL-12 pelos monócitos ativados pela gp96 (Ciocca et al., 2012; Janetzki et al., 2000).

Ciocca et al. (2007) desenvolveram uma estratégia de vacinação inovadora, pois além de incluírem os antígenos tumorais e as HSPs (gp96, HSP70 e HSP27, a primeira com maior representatividade), incorporaram também na vacina partículas de hidroxiapatite. Neste estudo, foram avaliados os efeitos secundários e a eficácia clínica em 20 pacientes com carcinoma mamário, melanoma, astrocitoma, oligodendrocitoma, meningioma, carcinoma da glândula parótida, rabdomiossarcoma e carcinoma do cólon. As doses vacinais (300 a 700 µL) provocaram reações cutâneas em 50% (10/20) dos pacientes, nomeadamente, eritema (35%), eritema com pápulas (10%) e eritema associado a dor localizada (5%). Por outro lado, apenas um (5%) dos pacientes imunizados manifestou reação sistêmica (ondas de calor), como consequência de uma dose vacinal superior. Nenhum dos pacientes manifestou reações autoimunes. Portanto, a toxicidade da vacina demonstrou-se, de um modo geral, baixa. Relativamente à sua eficácia clínica, os resultados demonstraram-se

promissores em pacientes com (1) doença recorrente, (2) tumores primários em crescimento e sem sinais de metastização e, em (3) tumores reduzidos cirurgicamente, não demonstrando, por outro lado, eficácia clínica em pacientes com múltiplas metástases. Por último, pela comparação das biópsias e estudos imunohistoquímicos, realizados nos períodos pré- e pós-vacinais, foi demonstrada a produção de uma resposta T celular.

Dos estudos desenvolvidos no âmbito das vacinas baseadas nas HSPs obtiveram-se várias conclusões: (1) as vacinas são bem toleradas e os efeitos secundários, quando presentes, são moderados, (2) a sua eficácia clínica depende do esquema vacinal e do estágio da doença e, (3) em estádios avançados da doença, as células neoplásicas adquirem mecanismos que conferem resistência à imunoterapia, podendo, por isso, explicar a maior eficácia vacinal num estágio inicial da doença. Além disso, essas vacinas demonstraram maior eficácia clínica quando administradas em doses e tempos vacinais superiores (Zhang & Zheng, 2013).

O futuro da imunoterapia anti-tumoral assenta em novas estratégias que visam a produção de uma resposta imunitária anti-tumoral mais eficiente. Essas abordagens incluem (1) a utilização de adjuvantes vacinais mais eficientes, (2) a modificação das células T durante a sua cultura *ex vivo* (vacinas celulares), de modo a aperfeiçoar o reconhecimento das células neoplásicas (3) o bloqueio de pontos de controlo imunitários (ex., CTLA-4, PD-1 e PD-L1) e, (4) a manipulação da resposta mediada pelas células Treg, de modo a reduzir a imunossupressão tumoral (Klebanoff, Acquavella, Yu, & Restifo, 2011; Regan et al., 2016). Por último, estão a decorrer investigações no âmbito das moléculas inibidoras das HSP90, na tentativa da sua utilização em terapias anti-neoplásicas (Neckers & Workman, 2012).

7.2.2 Limitações na utilização de vacinas baseadas nas HSPs

A utilização das vacinas baseadas nas HSPs está associada a algumas limitações, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias capazes de as ultrapassar.

Apesar da vacinação autóloga conduzir à expansão de células T específicas *in vivo* (Rivoltini et al., 2003), em muitas das neoplasias não é observado qualquer benefício clínico, pelo menos em estádios mais avançados da doença (Randazzo et al., 2012).

Uma das suas limitações é atribuída à fraca imunogenicidade das vacinas, podendo explicar, por isso, a sua maior eficácia em estádios iniciais da doença ou quando são administradas doses vacinais superiores (Zhang & Zheng, 2013). Para além disso, na maioria das situações são necessárias administrações múltiplas da vacina para a obtenção de benefício clínico. Outra das limitações diz respeito à quantidade de tecido tumoral removido cirurgicamente e, que se pode tornar um obstáculo na preparação dessas vacinas. Por último, embora seja suficiente a quantidade de tecido tumoral, a eficácia dessas vacinas pode ser prejudicada pela ocorrência de erros técnicos ou pela obtenção insuficiente de HSPs no processo de purificação da vacina (Randazzo et al., 2012).

7.3 APAVAC® - Vacina anti-tumoral baseada nas HSPs em Medicina Veterinária

A vacina APAVAC® é constituída por dois componentes: o antígeno e o adjuvante. O primeiro é constituído pelas HSPs (gp96) e pelos antígenos tumorais aos quais estas se ligam, sendo o componente que induz uma resposta imunitária antígeno-específica e dirigida às células neoplásicas. O segundo é constituído pelas nanopartículas de hidroxiapatite, um veículo seguro capaz de adsorver as HSPs e apresentá-las às células APC. A purificação dos complexos gp96/péptido é efetuado com o auxílio de uma coluna de cromatografia constituída por partículas de hidroxiapatite (Urodelia, 2017).

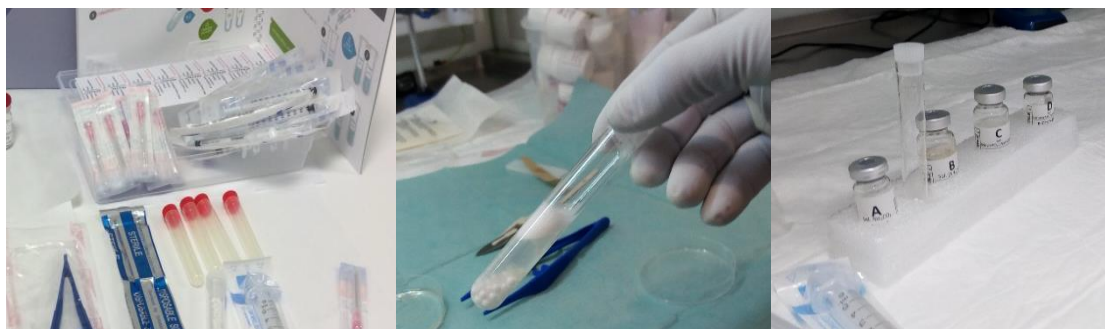
7.3.1 Preparação da vacina

A produção da vacina APAVAC® é executável em local com as condições mínimas de assépsia, nomeadamente uso de luvas esterilizadas e realização em câmara de fluxo laminar, sendo também necessário uma centrífugadora e equipamento de congelação (Ciocca et al., 2007). Todo o material necessário à sua preparação é providenciado pelo KIT APAVAC®.

A vacina autóloga é produzida através da purificação do tumor biopsado. O material biopsado deve ser armazenado a temperaturas de congelação (-18°C) e acondicionado em recipiente estéril com cloreto de sódio (Ciocca et al., 2007).

A preparação de 8 doses vacinais engloba três etapas principais: a extração, a purificação e a preparação das doses vacinais, cuja duração é em média 150 minutos (Urodelia, 2018). O procedimento detalhado pode ser consultado no anexo 1.

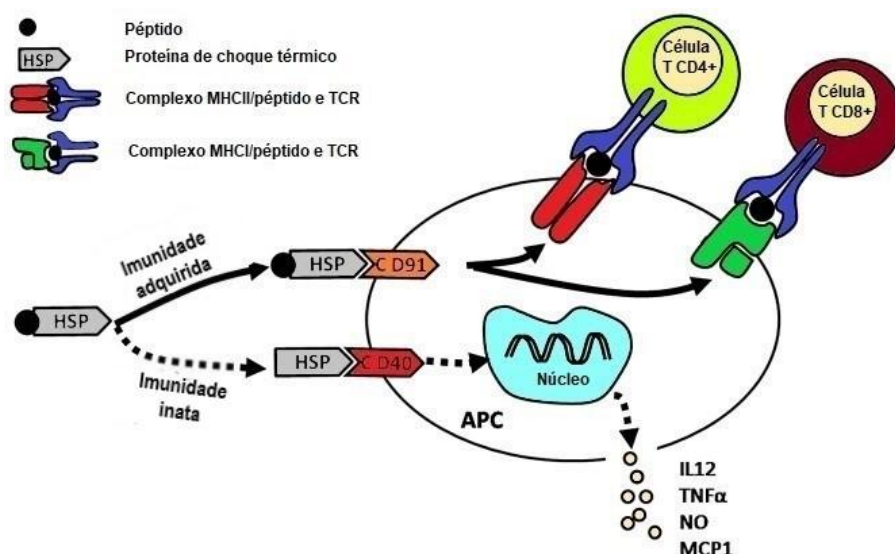
Figura 10: KIT APAVAC®: material (esquerda), homogeneização da amostra tumoral (centro) e solventes disponibilizados no KIT (direita) [originais do autor].



7.3.2 Mecanismo de ação

A interação do complexo péptido/gp96 com as APC conduz, por um lado, à apresentação dos antígenos tumorais aos linfócitos T CD4+ e T CD8+ (imunidade adquirida) e, por outro lado, a uma cascata de eventos antígeno-independentes (imunidade inata) [figura 11] (Zhang & Zheng, 2013).

Figura 11: Mecanismos imunitários (respostas imunitárias inata e adquirida) envolvidos na vacina APAVAC® (adaptado de Zhang & Zheng, 2013).



Legenda: HSP, proteína de choque térmico; APC, célula apresentadora de antígenos; MHC, complexo maior de histocompatibilidade; IL-12, interleucina 12; MCP-1, proteína-1 quimiotática de monócitos; NO, monóxido de azoto; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa.

7.3.2.1 Resposta imunitária adquirida

Após a administração da vacina, a apresentação antigénica ocorre nos linfonodos regionais. A gp96 interage com as APC (macrófagos e células dendríticas) através do recetor CD91, o principal recetor envolvido nessa interação (Binder, Han, & Srivastava, 2000b), resultando na endocitose do complexo péptido/gp96 e, o seu processamento em vesículas endocíticas não ácidas ou ácidas, estas últimas em menor proporção. Os complexos péptido/gp96 endocitados em vesículas endocíticas não ácidas migram para o citosol, onde são processados e transportados para o retículo endoplasmático, através dos transportadores associados ao processamento antigénico (TAP) (Basu, Binder, Ramalingam, & Srivastava, 2001). No retículo endoplasmático, os péptidos são associados às moléculas MHC-I, migrando, posteriormente, para a superfície celular, onde participam na ativação das células T CD8+ (apresentação antigénica cruzada). Por outro lado, os complexos péptido/gp96 endocitados em vesículas endocíticas ácidas, são associados às moléculas MHC-II, conduzindo à estimulação das células T CD4+ (apresentação antigénica clássica) (Zhang & Zheng, 2013). A apresentação antigénica cruzada e a ativação das células T CD8+ são as principais responsáveis pela resposta imunitária anti-tumoral (Caudill & Li, 2001). A produção de células T citotóxicas efetoras e, principalmente, as de memória, necessita da ativação concomitante das células T *helper* CD4+ e da produção de citocinas por estas células (Abbas et al., 2016).

A ativação completa das células T naïve ocorre, apenas se existir, também, um sinal co-estimulador (Abbas et al., 2016). Para que as células T sejam eficientes contra as células

neoplásicas, é necessária a expressão das moléculas co-estimuladoras (ex., B7-1, B7-2 e CD28), em ambas as células (T e APC). A quantidade de moléculas co-estimuladoras presentes nas células APC está correlacionada com a sua diferenciação (Frayssinet, Ciocca, & Rouquet, 2008).

7.3.2.2 Resposta imunitária inata

A interação da gp96 (não associada ao péptido) com os recetores de superfície expressos nas APC (ex., CD40, CD36, CD14, CD91, entre outros), conduz à estimulação da resposta imunitária inata (Kelly et al., 2018; Zhang & Zheng, 2013; Pawaria & Binder, 2011).

Da interação HSP/APC resultam fenómenos como (1) a secreção de citocinas inflamatórias (IL1- β , IL-12, TNF- α e GM-CSF) pelos macrófagos e células NK, responsáveis pela imunidade anti-tumoral quando estimulados pela IL-12 (Zhang & Zheng, 2013), (2) a secreção de quimiocinas (ex., MCP-1 e MIP-2) pelas células T (Lehner et al., 2000), (3) a produção de NO pelos macrófagos e células dendríticas (Panjwani, Popova, & Srivastava, 2002), (4) a diferenciação das células dendríticas e, o aumento da expressão das moléculas MHC-II, B7-2 (CD86) e CD40 (Singh-Jasuja et al., 2000), (5) a migração das células dendríticas para os linfonodos regionais que drenam o local de inoculação da vacina e, consequentemente, linfadenomegália (Binder, Anderson, Basu, & Srivastava, 2000a) e, por último, (6) a expressão do fator de transcrição NF- κ B, nos macrófagos e nas células dendríticas, responsável pela síntese dos mediadores inflamatórios mencionados anteriormente. A interação HSP/CD91 é responsável, também, pela ativação do fator de transcrição NF- κ B e pela síntese de citocinas inflamatórias, como resposta a uma fosforilação alternativa desse recetor (Pawaria & Binder, 2011). A estimulação dos recetores TLR4 e TLR2 pelas HSPs, nas células APC, está também descrito, embora seja controversa, uma vez que as preparações com HSPs podem conter lipopolissacáridos (LPS) contaminantes capazes de estimular esses recetores (Kelly et al., 2018; Simonet et al., 2013; Tsan, 2011).

Contudo, embora a resposta imunitária inata possa contribuir para a resposta anti-tumoral, é a resposta imunitária adquirida, produzida pelo complexo gp96/péptido, que assume maior importância na imunidade anti-tumoral (Zhang & Zheng, 2013).

7.3.3 Indicações de utilização

Por apresentar na sua composição proteínas autólogas, a imunoterapia APAVAC[®] deve ser administrada, unicamente, no animal ao qual foi realizada a biópsia tumoral. Além disso, é aconselhada a realização da contagem de leucócitos e a verificação da sua normalidade antes de se iniciar o protocolo vacinal (Urodelia, 2018).

A eficácia da imunoterapia APAVAC[®] é superior quando utilizada como terapia adjuvante, ou seja, após a remoção cirúrgica de tumores sólidos. A vacina pode ser administrada em

associação com a quimioterapia (convencional e metronômica) ou a radioterapia (Urodelia, 2018).

7.3.3.1 A quimioterapia metronômica associada à imunoterapia

A quimioterapia metronômica (QM) corresponde à administração oral de um fármaco citotóxico a doses minimamente tóxicas, segundo um protocolo terapêutico frequente ou contínuo (Hanahan, Bergers, & Bergsland, 2000; Kerbel & Kamen, 2004).

A QM exerce os seus efeitos anti-tumorais através de vários mecanismos: (1) inibição da angiogénese e vasculogénese tumorais (Gaspar, Henriques, Marconato, & Queiroga, 2018; Pasquier, Kavallaris, & André, 2010), (2) reversão da imunotolerância gerada pelo próprio tumor, através da depleção de células Treg e, do aperfeiçoamento da função das células T efectoras e dendríticas (Madondo, Quinn, & Plebanski, 2016), (3) erradicação e disfunção das células iniciadoras de tumores, através dos seus efeitos anti-angiogénicos (Loven, Hasnis, Bertolini, & Shaked, 2013) e, ainda, (4) indução da dormência tumoral (André, Carré, & Pasquier, 2014).

Existem vários fármacos citotóxicos que podem ser administrados num regime de QM, sendo a ciclofosfamida a mais utilizada. Esse fármaco citotóxico é um agente alquilante, assumindo efeitos anti-angiogénicos e imunomodeladores, favorecendo, desse modo, a imunidade anti-tumoral (Penel, Adenis, & Bocci, 2012). A sua posologia apresenta grande variabilidade nos protocolos descritos, quer em cães quer em gatos (Gaspar et al., 2018; Leo et al., 2014). Além da ciclofosfamida, outros fármacos citotóxicos podem ser administrados em regime de QM, nomeadamente, o clorambucil (4 mg/m² ou 0,2 mg/Kg, PO, SID) e a lomustina (2,8 mg/m², PO, SID) (Gaspar et al., 2018).

De modo a potenciar os seus efeitos anti-angiogénicos, a QM é combinada com anti-inflamatórios não esteróides (AINE's), talidomida e/ou inibidores dos recetores da tirosina-quinase (Leo et al., 2014).

As ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) são expressas na neovasculatura tumoral e nas próprias células neoplásicas, desempenhando, por isso, um papel importante no início e progressão tumorais, em grande parte pelos seus efeitos angiogénicos e imunomodeladores (Elmslie, Glawe, & Dow, 2008; Gaspar et al., 2018). Por isso, os AINE's são um grupo farmacológico amplamente utilizado em associação com a QM, por serem capazes de inibir as ciclooxigenases COX-1 e COX-2. Além disso, os inibidores das COX-2 aperfeiçoam as respostas anti-tumoral e à imunoterapia, ao bloquearem a produção de fatores imunossuppressores nas células MDSC (Talmadge et al., 2007). Têm sido utilizadas em regime de QM várias moléculas pertencentes a este grupo farmacológico, nomeadamente o piroxicam, o meloxicam, o firocoxib e o carprofeno (Mohammed et al., 2002).

O toceranib é um composto antineoplásico, tratando-se de um inibidor dos recetores de tirosina-quinase. Os recetores de tirosina-quinase são proteínas celulares de superfície que desempenham funções importantes na proliferação, diferenciação e sobrevivência das

células, quando estimulados pelos seus ligandos (Blackwood et al., 2012). As moléculas inibidoras dos recetores de tirosina-quinase são inibidores competitivos que bloqueiam, de um modo reversível ou irreversível, o local de ligação da molécula de adenosina trifosfato (ATP) na quinase. Desse modo, na ausência de ATP, a proteína quinase não é capaz de promover a fosforilação dos seus substratos, resultando a inibição da transdução de sinais posteriores (London et al., 2009; Marconato et al., 2008). Essas moléculas apresentam atividade anti-angiogénica, bem como atividade anti-tumoral em várias neoplasias, nomeadamente, sarcomas e carcinomas metastáticos, melanoma, mieloma múltiplo e mastocitoma (London et al., 2012; London et al., 2009).

7.3.3.2 A quimioterapia convencional associada à imunoterapia

A quimioterapia convencional (QC) emprega fármacos citotóxicos em doses elevadas e, está indicada no tratamento de neoplasias sensíveis à quimioterapia, incluindo as neoplasias hematopoiéticas (linfoma, leucemia e mieloma múltiplo) e neoplasias sólidas metastáticas (ex., osteossarcoma e hemangiossarcoma). Além disso, a sua administração pode ser efetuada após a excisão cirúrgica do tumor (terapêutica adjuvante) ou previamente à instituição do tratamento definitivo (terapêutica neoadjuvante) (Dobson & Lascelles, 2011). Os fármacos citotóxicos podem, por um lado, causar lesões no ADN, prevenir a replicação e/ou induzir a apoptose celular e, por outro lado, atuar numa fase específica do ciclo celular (ex., mitose), impedindo, assim, a conclusão desse processo celular (Dobson & Lascelles, 2011).

A eficácia clínica de um determinado protocolo quimioterápico é atribuída, principalmente, ao efeito citotóxico sobre as células neoplásicas. Contudo, alguns fármacos citotóxicos (ex., ciclofosfamida, doxorrubicina, metotrexato, cisplatina, oxaliplatina e 5-fluorouracilo) apresentam, igualmente, propriedades imunomoduladoras, podendo, por isso, aperfeiçoar a resposta imunitária produzida pelas vacinas anti-tumorais. Essa sinergia pode ser mediada por vários mecanismos, dependendo da molécula citotóxica e da imunoterapia anti-tumoral administrada, assim como dos protocolos terapêuticos utilizados (Hodge, Ardiani, Farsaci, Kwilas, & Gameiro, 2012).

As propriedades imunomoduladoras atribuídas aos fármacos citotóxicos incluem: (1) modelação do fenótipo das células neoplásicas através da alteração da expressão de moléculas de superfície (ex., antígenos tumorais e MHC-I), tornando-as, por isso, mais suscetíveis à destruição mediada pelas células T (Hodge et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2010); (2) indução da “morte imunogénica” das células neoplásicas, conduzindo à ativação de células dendríticas e, facilitando, desse modo, a apresentação antigénica cruzada segundo o contexto MHC-I, resultando, por isso, a produção de células T CD8+ mais eficientes (Hodge et al., 2012; Zitvogel, Kepp, & Kroemer, 2011); (3) indução de leucopenia acompanhada da proliferação compensatória de células T, sobretudo células T tumor-

específicas; e por último, (4) modelação das células imunitárias Treg e MDSC (Hodge et al., 2012).

7.3.4 Protocolo vacinal

No Homem, o protocolo de administração das vacinas anti-tumorais baseadas na gp96 não se encontra bem definido (Caudill & Li, 2001), variando consoante a vacina utilizada e os investigadores envolvidos no ensaio clínico (Ciocca et al., 2007; Janetzki et al., 2000; Rivoltini et al., 2003; Testori et al., 2008).

Por isso, para a redução da progressão tumoral em doentes oncológicos, a frequência de vacinação deve ser elevada. Se por um lado, as células neoplásicas conseguem induzir tolerância imunitária através da subexpressão de moléculas co-estimuladoras, por outro a presença de uma carga tumoral elevada é capaz de superar a resposta anti-tumoral (Caudill & Li, 2001).

Nos vários estudos realizados em Medicina Veterinária, o protocolo vacinal utilizado em cães compreendeu a administração subcutânea de 500 µL da vacina, uma vez por semana, durante 1 mês, e depois mensal, durante 4 meses, perfazendo um total de 8 administrações (Marconato et al., 2014; Marconato et al., 2015; Simonet et al., 2013; Simonet, Josephine, Bayol, & Frayssinet, 2017). A administração pode ser realizada por via subcutânea ou intradérmica, mas nunca por via endovenosa (Urodelia, 2018).

7.3.5 Efeitos secundários

Teoricamente, existem riscos inerentes à utilização da vacina anti-tumoral baseada na gp96, nomeadamente, (1) a ocorrência de uma reação inflamatória mediada por endotoxinas, desencadeada pela libertação de citocinas pro-inflamatórias (ex., TNF-α) pelas APC ativadas e, (2) reações autoimunes, como consequência da ativação de células T reativas a péptidos-*self* contidos nos complexos vacinais gp96/péptido (Caudill & Li, 2001).

Por se tratar de uma vacina autóloga, qualquer sinal de febre acompanhado de sinais neurológicos é indicativo de uma meningoencefalite autoimune, cuja terapêutica com doses elevadas de corticosteróides deve ser instituída o mais breve possível (Urodelia, 2018).

Simonet et al. (2013) demonstraram em cães com linfoma não Hodgkin de células B (n=3) e T (n=1), a segurança associada à administração de uma vacina baseada nas HSPs gp96 e HSP70, não tendo sido observado nenhum efeito secundário à sua administração.

A terapêutica com a vacina APAVAC®, associada à quimioterapia convencional, em cães com linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e linfoma B indolente, foi bem tolerada e, os efeitos adversos foram consistentes com os esperados numa terapêutica com doses elevadas. Em ambas as doenças não foram observadas reações autoimunes relacionadas com a administração da imunoterapia (Marconato et al., 2015; Marconato et al., 2014).

Por último, outro estudo demonstrou a ausência de efeitos secundários decorrentes da administração da vacina APAVAC[®], após a citoredução cirúrgica do tumor, em dois cães diagnosticados com mastocitoma de grau II e III, sem evidência de metastização (Simonet et al., 2017).

7.3.6 Contra-indicações

Como existe a possibilidade da ocorrência de reações autoimunes, a utilização da vacina APAVAC[®] está contraindicada em animais com história prévia de doenças autoimunes, incluindo a diabetes insulínica dependente (Urodelia, 2018).

7.3.7 Interações medicamentosas

Deve-se ter em atenção a administração concomitante, com a vacina APAVAC[®], dos fármacos citotóxicos asparaginase, vincristina, ciclofosfamida e/ou metotrexato, especialmente na terapêutica de animais com linfoma de células T, por potenciarem a ocorrência de encefalite autoimune nesses animais (Urodelia, 2018).

De um modo geral, a instituição de terapêutica com corticosteróides deve ser evitada durante a imunoterapia. Contudo, caso se revele essencial a sua utilização, a sua administração deve ser em doses terapêuticas que não comprometam a resposta imunitária (Urodelia, 2018).

7.3.8 Eficácia clínica

Marconato et al. (2014) estudaram, em cães com DLBCL, a eficácia clínica relacionada com a administração da vacina APAVAC[®], através da comparação dos “endpoints” TTP - tempo até à progressão da doença (tempo decorrido entre o início da terapêutica e a progressão da doença) e LSS - tempo de sobrevivência específico do linfoma (tempo entre o início da terapêutica e a morte do animal por causas relacionadas com o linfoma), em dois grupos de doentes (n=19) (Vail et al., 2010). Ao grupo 1 (n=12) foi administrada a vacina em associação com a quimioterapia convencional (L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, lomustina, prednisolona) e, ao grupo 2 (n=7) o mesmo protocolo quimioterápico associado a uma vacina placebo. Esta vacina continha hidroxapatite, mas não a componente antigénica tumoral. As medianas dos valores dos “endpoints” TTP e LSS foram 7 e 3 vezes superiores no grupo 1, respetivamente, comparativamente aos valores obtidos no grupo 2 (grupo 1: TTP=304 dias, LSS=505 dias; grupo 2: TTP=41 dias, LSS=159 dias). Dos cães vacinados com a vacina APAVAC[®] (grupo 1), todos alcançaram a remissão completa, contrastando com os 71,4% (5/7) observados no grupo 2. Contudo, 58,3% (7/12) dos animais pertencentes ao grupo 1 saíram de remissão e, alcançaram, posteriormente, uma segunda remissão duradoura, contrariamente ao verificado no grupo 2. A resposta imunitária anti-tumoral *in vivo* foi avaliada, 48h após a última administração vacinal, pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (TCHT). Este teste revelou a presença de uma

resposta imunitária celular de memória, pelo desenvolvimento de máculas com um diâmetro superior a 2 mm, em todos os animais pertencentes ao grupo 1.

O teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (TCHT) avalia *in vivo* a resposta imunitária produzida pelas células T. O seu procedimento é simples e consiste na injeção intradérmica do lisado tumoral, após a conclusão da imunoterapia. Esta prova tem como objetivo a estimulação da apresentação antigénica e, o recrutamento, ao local de administração, de células T de memória, T CD8+ e macrófagos ativados. Uma resposta positiva traduz-se na observação de eritema e/ou endurecimento da região, 42 a 72 horas após a administração do lisado tumoral (Puccetti et al., 1994).

Marconato et al. (2015) estudaram ainda, em cães com linfoma B indolente e em estágio avançado (estádio IV e V), a eficácia clínica da administração da imunoterapia APAVAC®, pela comparação dos mesmos “endpoints”, em dois grupos de doentes (n=45). Ao grupo 1 (n=20) foi administrada apenas a quimioterapia convencional (L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, lomustina, prednisolona) e, ao grupo 2 (n=25) foi administrado o mesmo protocolo quimioterápico, mas agora associado à vacina APAVAC®. A percentagem de cães que alcançaram a remissão completa e/ou parcial foi significativamente superior nos animais vacinados, comparativamente aos não vacinados (100% vs. 80%). As medianas dos valores dos “endpoints” TTP e LSS foram 2,5 vezes e 1,7 vezes superiores nos cães vacinados, respetivamente, comparativamente aos cães não vacinados (grupo 2: TTP=209 dias, LSS=349 dias; grupo 1: TTP=85 dias, LSS=200 dias). Contudo, as diferenças observadas nos valores dos “endpoints” LSS, para cada um dos grupos, não se revelaram estatisticamente significativas ($p>0,05$). A avaliação da resposta imunitária anti-tumoral *in vivo* foi, igualmente, realizada pelo TCHT, em 18 dos 25 animais vacinados. Este teste revelou resultados positivos (endurecimento ou eritema no local de injeção, durante um período superior a 48h) em 72,2% (13/18) dos animais vacinados, tendo-se, ainda, observado nestes animais tempos de sobrevivência superiores.

Em suma, os dois estudos realizados demonstraram a segurança, a viabilidade e a eficácia clínica da quimioimunoterapia com a vacina APAVAC®, nas terapêuticas do linfoma B indolente e DLBCL (Marconato et al., 2015).

Parte II

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA E DOS
EFEITOS SECUNDÁRIOS DA IMUNOTERAPIA
APAVAC[®] EM CÃES E GATOS COM CANCRO -
ESTUDO RETROSPETIVO DE 20 CASOS**

1 Objetivos

No âmbito da dissertação, este estudo foi concebido com o objetivo de avaliar os efeitos secundários e a resposta clínica numa amostra de animais com várias neoplasias e tratados com recurso à quimioimunoterapia. A imunoterapia em estudo consistiu na administração da vacina APAVAC[®], uma vacina anti-tumoral baseada na proteína de choque térmico gp96. Pretendeu-se a (1) caracterização da amostra em estudo, relativamente à espécie, ao género, tipo de neoplasia, exames complementares de diagnóstico, estadiamento clínico e terapêutica; (2) avaliação da resposta clínica, bem como a evolução clínica dos doentes; e (3) avaliação dos efeitos secundários durante a quimioimunoterapia.

Pretendeu-se, assim, aprofundar o conhecimento sobre as opções terapêuticas adjuvantes recentes em Medicina Veterinária, nomeadamente as vacinas anti-tumorais.

2 Materiais e métodos

2.1 Animais

2.1.1 Critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídos cães e gatos com cancro (n=20), machos ou fêmeas, submetidos a tratamento quimioterápico – quimioterapia convencional (QC) ou quimioterapia metronómica (QC) - associado a imunoterapia com APAVAC[®], no Hospital Veterinário de Berna, desde Março de 2015 a Maio de 2018.

No estudo presente foram incluídos todos os animais submetidos a quimioimunoterapia, independentemente das terapêuticas anti-neoplásicas anteriormente aplicadas.

A administração da quimioimunoterapia foi efetuada a animais com várias neoplasias, nomeadamente, adenocarcinoma mamário, metástases de carcinoma mamário, linfoma, melanoma oral, fibrossarcoma, hemangiopericitoma, sarcóide felino e sarcoma de tecidos moles.

A identificação dos animais submetidos a quimioimunoterapia foi realizada por consulta da base de dados referente aos casos tratados com a vacina APAVAC[®]. A recolha de dados foi efetuada com base na história clínica, análises laboratoriais e exames complementares, obtidos a partir dos programas informáticos Winvet[®] e Bizagi[®].

Todos os animais que iniciaram a quimioimunoterapia foram submetidos à realização de biópsia e análise histopatológica, de modo a confirmar o diagnóstico da neoplasia e, providenciar material para a produção da vacina APAVAC[®].

Todos os animais deste estudo realizaram um hemograma completo e perfil bioquímico (medição da ALT – alanina aminotransferase, ALP – fosfatase alcalina, e da creatinina) antes de iniciarem o protocolo com quimioimunoterapia (T₀). Esses animais foram submetidos a um seguimento clínico, realizado no hospital veterinário e, que incluiu a consulta de seguimento, a avaliação da resposta clínica, a realização de análises sanguíneas (hemograma completo e medição dos parâmetros séricos creatinina, ALT e/ou

ALP), a monitorização da ocorrência de reações adversas e, a administração de fármacos citotóxicos nos animais submetidos a QC.

No que diz respeito à apresentação de dados no decorrer da dissertação, foi efetuada a identificação numérica dos animais de acordo com o tipo de neoplasia (doentes 1 a 20). Os doentes 1 a 12 são cães e os de 13 a 20 são gatos [tabela 7].

2.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo todos os animais que não possuíssem análises previamente ao começo da quimioimunoterapia (T_0), assim como, análises de seguimento e registo da história clínica necessárias.

2.2 Preparação da vacina

A preparação da vacina APAVAC[®] foi realizada de acordo com o protocolo publicado pelo fabricante [anexo 1], tendo sido produzida a partir das peças cirúrgicas excisionadas (melanoma oral, hemangiopericitoma e carcinoma mamário) ou das biópsias realizadas para esse propósito (sarcóide felino, linfoma, sarcoma de tecidos moles, metástase de carcinoma mamário e fibrossarcoma).

O material biopsado foi acondicionado em meio apropriado, contendo cloreto de sódio e, armazenado a temperaturas de congelação (-18°C). Para cada animal, foi efetuada a preparação de 8 doses vacinais, de acordo com as instruções fornecidas no KIT APAVAC[®].

O tecido tumoral, bem como todo o material necessário à preparação da vacina foram manipulados em condições de assépsia, em câmara de fluxo laminar.

A preparação da vacina envolveu três etapas principais: a extração, a purificação e a preparação de doses vacinais. Inicialmente, foi adicionado ao tecido tumoral 4 mililitros do solvente A (bicarbonato de sódio, 30 mmol/L, pH 7), com o objetivo de promover a destruição da membrana celular das células neoplásicas, possibilitando, assim, a migração das proteínas citoplasmáticas para a solução (Urodelia, 2018). Após a homogeneização dessa solução, foi efetuada a sua centrifugação, preservando posteriormente o líquido sobrenadante. A esse líquido foi adicionado um igual volume do solvente B (sulfato de amónia), com o objetivo de desencadear a precipitação das proteínas a baixas temperaturas (Urodelia, 2018). Após a precipitação das proteínas, foi adicionado o solvente C (tampão fosfato), obtendo-se, assim, a solução de extração (lisado tumoral). Essa solução, constituída por proteínas citoplasmáticas, foi transferida para uma coluna de cromatografia contendo nanopartículas de hidroxapatite, com o objetivo de purificar essas proteínas. Para a eliminação das proteínas indesejáveis, foi adicionado, à coluna de cromatografia, o solvente C (tampão fosfato). Finalmente, foi adicionado, à coluna de cromatografia, o solvente D (carboximetilcelulose a 2%), com o objetivo de dispersar o meio proteico e as proteínas de interesse (complexos gp96/péptido). Dessa solução final foram retirados 500 μL para 8 seringas de 1 mililitro, obtendo-se, assim, as 8 doses vacinais. Uma vez

preparadas, essas doses vacinais foram armazenadas a temperaturas de congelamento (-18°C), até à sua utilização (Urodelia, 2018).

2.3 Estadiamento clínico

Os animais incluídos neste estudo foram submetidos a estadiamento clínico no momento do diagnóstico e, previamente à instituição da terapêutica com quimioimunoterapia.

O estadiamento clínico foi estabelecido com base na informação recolhida através do exame físico dos animais, das análises sanguíneas (hemograma completo e bioquímicas), dos exames complementares imagiológicos (radiografia torácica, ecografia abdominal e tomografia computadorizada) e, das análises histopatológicas ou citológicas (PAAF – punção aspirativa de agulha fina).

No linfoma canino efetuou-se, igualmente, a avaliação citológica do baço e/ou fígado consoante o seu aspeto ecográfico, bem como a imunofenotipagem das células neoplásicas. A imunofenotipagem do linfoma envolve técnicas de diagnóstico molecular, apresentando, igualmente, utilidade no diagnóstico inicial da doença. Para a determinação do fenótipo imunológico são utilizados anticorpos dirigidos aos linfócitos (anticorpos anti-linfócitos), podendo ser aplicados em amostras histopatológicas (imunohistoquímica) ou em meios líquidos contendo células em suspensão (citometria de fluxo) (Vail, Pinkerton, & Young, 2013). No estudo realizado, para a imunofenotipagem do linfoma canino foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica e/ou citometria de fluxo. Na citometria de fluxo, a imunofenotipagem foi efetuada a partir do aspirado ganglionar, acondicionado em meio de transporte apropriado e contendo RPMI-1640. Por outro lado, na técnica de imunohistoquímica foi utilizada a biópsia de linfonodo acondicionada em formaldeído, bem como o emprego de anticorpos anti-CD3 na imunomarcação das células T e, anticorpos anti-CD79 alfa ou anti-CD20 na imunomarcação das células B.

A metastização ganglionar foi pesquisada através do exame ecográfico abdominal, PAAF ecoguiada em situações de linfadenomegália e análise histopatológica. Esta última avaliou o envolvimento dos linfonodos regionais contidos na peça cirúrgica a analisar, nos casos em que se optou pela citoredução cirúrgica previamente à instituição da terapêutica adjuvante anti-neoplásica.

A avaliação da extensão da doença, o envolvimento de outros órgãos ou estruturas, bem como a pesquisa de metástases à distância foram efetuadas através da realização de 3 projeções radiográficas torácicas (laterolateral esquerda, direita e ventrodorsal ou dorsoventral) e do exame ecográfico abdominal detalhado.

O estadiamento clínico foi estabelecido com recurso a sistemas de classificação, definidos pela Organização Mundial de Saúde/*World Health Organization* (OMS/WHO).

Relativamente às gatas com neoplasia mamária (n=6), o estadiamento clínico foi estabelecido de acordo com a classificação TNM (“tumour-node-metastasis”), ligeiramente

modificada por McNeill e outros colaboradores (2009), sendo os tumores mamários agrupados em 4 estádios diferentes (I,II,III e IV), consoante as dimensões do tumor primário (T1, T2 e T3), o envolvimento dos linfonodos regionais (N0 e N1) e, a existência de metástases à distância (M0 e M1).

Na cadela com carcinoma mamário (n=1), o estadiamento clínico foi também estabelecido de acordo com a classificação TNM, agrupando a doença em 5 estádios diferentes (I, II, III, IV e V), consoante as dimensões do tumor primário (T1, T2 e T3), o envolvimento dos linfonodos regionais (N0 e N1) e, a existência de metástases à distância (M0 e M1) (Withrow, Vail, & Page, 2013).

No fibrossarcoma (n=1), no hemangiopericitoma (n=1) e no sarcoma de tecidos moles (n=1), o estadiamento clínico foi estabelecido de acordo com a classificação TNM, mas apresentando modificações baseadas na classificação estabelecida em humanos com sarcoma de tecidos moles e, definida pelo *American Joint Committee on Cancer*. Nesse sistema de classificação, os animais são agrupados em 4 estádios diferentes (I,II,III,IV), consoante as dimensões do tumor primário (T1 e T2), a sua profundidade (T1a, T1b, T2a, T2b), o envolvimento dos linfonodos regionais (N0 e N1) e, a existência de metástases à distância (M0 e M1) (Withrow et al., 2013).

No linfoma em cães (n=8), o estadiamento clínico foi estabelecido de acordo com a classificação definida pela OMS/WHO, sendo os animais agrupados em 5 estádios diferentes (I, II, III, IV e V), consoante o envolvimento dos linfonodos (limitado a um linfonodo, a uma região ou envolvimento generalizado), o envolvimento do baço e/ou fígado, bem como, a manifestação da doença na corrente sanguínea, medula óssea e/ou outros sistemas orgânicos. A cada estágio é atribuído, igualmente, um sub-estádio: *a*, caso não existam sinais sistêmicos, ou *b*, caso ocorra o inverso (Withrow et al., 2013).

No melanoma oral (n=1), o estadiamento clínico foi também estabelecido de acordo com a classificação TNM definida pela OMS/WHO, sendo os animais agrupados em 4 estádios diferentes (I, II, III e IV), consoante as dimensões do tumor primário (T1, T2 e T3), o envolvimento dos linfonodos regionais (N0, N1 e N2) e, a existência de metástases à distância (M0 e M1) (Withrow et al., 2013).

As múltiplas combinações, a classificação e a descrição dos diferentes estádios clínicos da doença, para as diferentes neoplasias, encontram-se descritas no anexo 2.

2.4 Terapêutica

Para cada um dos doentes, os planos terapêuticos instituídos tiveram em conta o estágio clínico da doença, o tipo de neoplasia, o tipo histológico, a presença de doenças concomitantes, o estado de saúde geral do animal e, em última instância, a aprovação dos tutores.

A cirurgia citoredutora foi efetuada previamente à instituição do protocolo com quimioimunoterapia, no hemangiopericitoma (doente 1), melanoma oral (doente 2) e carcinoma mamário (doentes 15 a 20).

No âmbito do estudo, os protocolos terapêuticos instituídos consistiram na associação da imunoterapia APAVAC®, uma modalidade terapêutica adjuvante, com os protocolos de quimioterapia convencional (QC) ou metronômica (QM), consoante a neoplasia considerada. Nas tabelas 7 e 8 estão apresentados os protocolos terapêuticos instituídos a cada um dos doentes, assim como o número de animais aos quais foi administrado os respetivos protocolos terapêuticos.

Tabela 7: Protocolos terapêuticos instituídos nos doentes em estudo, em associação com a imunoterapia APAVAC®.

| | Doentes | Neoplasia | Terapêutica |
|-------|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| Cães | 1 | Hemangiopericitoma | APAVAC® + QM |
| | 2 | Melanoma oral | APAVAC® + QM |
| | 3 | Sarcoma de tecidos moles | APAVAC® + QM/Toceranib |
| | 4 | Metástase carcinoma mamário | APAVAC® + QM + Epirrubicina |
| | 5 a 12 | Linfoma | APAVAC® + CHOP |
| Gatos | 13 | Fibrossarcoma | APAVAC® + QM |
| | 14 | Sarcóide felino | APAVAC® + aciclovir |
| | 15 a 20 | Adenocarcinoma mamário | APAVAC® + QM |

Legenda: CHOP, ciclofosfamida-doxorrubicina-vincristina-prednisolona; QM, quimioterapia metronômica.

Tabela 8: Protocolos quimioterápicos instituídos nas neoplasias em estudo, assim como o número de animais aos quais foi administrado os respetivos protocolos.

| Neoplasia | Terapêutica | Nº de animais |
|-------------------------------------|--|---------------|
| Hemangiopericitoma Melanoma oral | QM [ciclofosfamida (15 mg/m ² , PO, SID) e piroxicam (0,3 mg/Kg, PO, SID)] | 2 |
| Sarcoma de tecidos moles | QM [ciclofosfamida (15 mg/m ² , PO, SID) e firocoxib (5 mg/Kg, PO, SID)] e toceranib (2,5-3,25 mg/Kg, PO, a cada 72 horas), de modo faseado | 1 |
| Metástase carcinoma mamário | QM [ciclofosfamida (15 mg/m ² , PO, SID) e piroxicam (0,3 mg/Kg, PO, SID)] e epirrubicina (30 mg/m ² , IV, a cada 21 dias) | 1 |
| Linfoma | CHOP | 8 |
| Fibrossarcoma | QM [ciclofosfamida (15 mg/m ² , PO, SID) e meloxicam (1º mês | 7 |

| | | |
|-------------------|---|--|
| Carcinoma mamário | na dose 0,05 mg/Kg e, nos restantes 5 meses, na dose 0,025 mg/Kg, PO, SID)] | |
|-------------------|---|--|

Legenda: CHOP, ciclofosfamida-doxorrubicina-vincristina-prednisolona; QM, quimioterapia metronómica; PO, *per os*; SID, uma vez ao dia.

No gato com sarcóide felino (doente 14), não se optou pela administração de um fármaco citotóxico, mas na administração de um antivírico, o aciclovir (20 mg/Kg, PO, SID).

A QM teve a duração de 6 meses, em todos os animais submetidos a esta modalidade terapêutica.

Nos doentes 5 a 12 foi administrado, durante 19 semanas, o protocolo CHOP [C, de ciclofosfamida; H, de hidroxidancorrubicina; O, de Oncovin[®] (vincristina); P, de prednisolona] baseado no protocolo UW-Madison-Short [tabela 9].

Tabela 9: Representação esquemática do protocolo CHOP, realizado nos cães com linfoma e baseado no protocolo UW-Madison-Short (adaptado de Vail, Pinkerton, Young, 2013).

| | Semana do protocolo | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| Vincristina (0,5 mg/m ² , IV) | X | | X | | | X | | X | | | X | | X | | | X | | X | |
| Ciclofosfamida (200 mg/m ² , IV) | | X | | | | | X | | | | | X | | | | | X | | |
| Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV) | | | | X | | | | | X | | | | | X | | | | | X |
| Prednisolona* | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | |

Legenda: IV, endovenoso; PO, *per os*; BID, duas vezes ao dia; SID, uma vez ao dia.

*A prednisolona foi administrada segundo o seguinte protocolo: semana 1: 1 mg/Kg, PO, BID; semana 2: 0,5 mg/Kg, PO, BID; semana 3: 0,5 mg/Kg, PO, SID; semana 4: 0,25 mg/Kg, PO, SID.

A vacina APAVAC[®] (500 µL) foi administrada, em todos os animais em estudo, tendo-se realizado a tricotomia e a limpeza assética da região, previamente a administração da imunoterapia por via intradérmica ou subcutânea, próxima de um gânglio linfático. O protocolo vacinal baseou-se em artigos publicados por Marconato et al. (2014), consistindo em 4 administrações semanais e outras 4 administrações mensais, perfazendo um total de 8 imunizações.

Nos doentes 1, 2, 3, 4, 13, 15, 16, 17, 18, 19 e 20, o protocolo vacinal foi iniciado na semana em que se iniciou a QM. Nos doentes 5 a 12, a administração da imunoterapia foi iniciada após a instituição do protocolo CHOP, quando os animais se encontravam em remissão completa da doença. Por último, no doente 14, a sua administração foi iniciada no momento em que se iniciou o aciclovir.

Para além da administração da quimioimunoterapia, os planos terapêuticos incluíram a administração de gastroprotetores (omeprazol, sucralfato e/ou famotidina), antieméticos (maropitant e metaclopramida), estimulantes do apetite (mirtazapina), terapêutica de suporte em quadros diarreicos (pré-bióticos, probióticos e metronidazol), assim como, antibióticos, quando considerado necessário.

2.5 Avaliação da resposta clínica

A avaliação da resposta clínica nos animais em estudo baseou-se nos critérios “*response evaluation criteria in solid tumors*” (RECIST), versão 1.0, definidos pela WHO (Nguyen, Thamm, Vail, & London, 2015). Para o linfoma canino, a avaliação da resposta clínica baseou-se em critérios semelhantes aos definidos pelo RECIST, versão 1.0 (Vail, Michels, Khanna, Selting, & London, 2010) [tabela 10]. Tomando como referência as medições efetuadas no tempo T_0 , o estado de remissão foi aferido com base no exame físico do animal, na palpação, bem como na medição das lesões alvo e linfonodos afetados, na citologia dos linfonodos afetados (metástases ganglionares), assim como, nos exames ecográfico e radiográfico (metástases à distância).

Tabela 10: Critérios de avaliação da resposta clínica em neoplasias sólidas e no linfoma canino (adaptado de Nguyen et al., 2015; Vail et al., 2010).

| Resposta clínica | Neoplasias sólidas | Linfoma |
|--------------------|--|---|
| Remissão completa | Resolução de 100% do tumor, diâmetro linfonodos afetados <10mm | Regressão de 100% da doença, dimensão dos linfonodos normal |
| Remissão parcial | Redução de lesões >30% | Redução >30% na média dos diâmetros dos linfonodos alvos |
| Doença estável | Aumento de lesões <20% ou redução de lesões <30% | Aumento dos linfonodos alvos <20% ou redução <30% |
| Doença progressiva | Aumento de lesões >20%, diâmetro lesões >5 mm e novas lesões | Aumento >20% na média dos diâmetros dos linfonodos alvos |

2.6 Descrição e classificação dos efeitos secundários

Para a análise dos efeitos secundários foi tido em conta a informação registada nas fichas clínicas dos animais e, as respetivas, análises sanguíneas (hemograma completo e bioquímicas). A descrição dos efeitos secundários associados à administração da quimioimunoterapia, a frequência de ocorrência e a classificação quanto à sua gravidade (grau 1 a 5) basearam-se nos critérios enunciados pelo *Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1* (VCOG-CTCAE, 2011).

Tabela 11: Descrição da gravidade dos efeitos secundários em graus (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Graus | Descrição |
|-------|--|
| 1 | Ligeiro; assintomático ou sintomas ligeiros; intervenção não indicada |
| 2 | Moderado; intervenção mínima ou não invasiva; limitação moderada das atividades diárias do animal |
| 3 | Grave mas sem colocar em risco a vida do animal; hospitalização indicada; limitação marcada das atividades diárias do animal |
| 4 | Muito grave; coloca em risco a vida do animal; intervenção urgente está indicada |
| 5 | Morte do animal relacionada com o efeito adverso |

Os efeitos secundários avaliados incluíram a toxicidade hematopoiética, gastrointestinal, renal, hepática, a ocorrência de efeitos adversos no local de administração e, a manifestação de reações imuno-alérgicas.

A identificação da toxicidade hematopoiética baseou-se na avaliação do hematócrito, número de plaquetas e glóbulos brancos; as toxicidades renal e hepática, basearam-se na avaliação dos valores de creatinina, ALT e ALP, respetivamente; a toxicidade gastrointestinal, através da identificação dos sinais clínicos anorexia, náusea, vômito e/ou diarreia; as reações adversas no local de administração através da identificação dos sinais clínicos rubor, edema e dor; e, por último, a ocorrência de reações imuno-alérgicas, através da identificação de sinais compatíveis com reações alérgicas ou de hipersensibilidade, reação anafilática, vasculite e reação autoimune. No anexo 3 é descrita, pormenorizadamente, a classificação, em graus, das toxicidades hematopoiética, gastrointestinal, hepática, renal, reações adversas no local de administração e as associadas com reações imuno-alérgicas, com base no VCOG-CTCAE (2011).

As análises bioquímicas foram realizadas a partir da colheita de sangue para tubo de heparina e, leitura analítica dos parâmetros ALT, ALP e creatinina, no aparelho de medição bioquímica SPOTCHEM™EZ SP-4430 (Arkray®). Por outro lado, o hemograma completo foi realizado a partir da colheita de sangue para tubo de EDTA e, leitura analítica dos parâmetros glóbulos brancos, plaquetas e hematócrito, no aparelho de medição BC-5000 Vet (Mindray®). Além disso, foi também efetuada a avaliação de esfregaços sanguíneos ao microscópio ótico, de modo a avaliar a presença de agregação plaquetária, em situações de trombocitopenia.

A tabela 12 descreve os valores de referência para os parâmetros sanguíneos a partir dos quais foram identificados, nos animais em estudo, as toxicidades hematopoiética, renal e hepática.

Tabela 12: Valores de referência para os parâmetros sanguíneos considerados na avaliação das toxicidades hematopoiética, renal e hepática, no decorrer da quimioimunoterapia.

| Bioquímicas ¹ | | |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Parâmetro | Cão | Gato |
| Alanina aminotransferase (ALT) | >113 IU/L | >105 IU/L |
| Fosfatase alcalina (ALP) | >130 IU/L | >123 IU/L |
| Creatinina | >1,6 mg/dL | >1,9 mg/dL |
| Hemograma ² | | |
| Parâmetro | Cão | Gato |
| Plaquetas (trombocitopénia) | < 117 x 10 ³ /µL | <100 x 10 ³ /µL |
| Neutrófilos (neutropénia) | <4 x 10 ³ /µL | <2,1 x 10 ³ /µL |
| Hematócrito (anemia) | < 39% | < 28% |

Legenda: ¹Valores de referência para os parâmetros sanguíneos disponibilizados pelo aparelho de medição SPOTCHEM™EZ SP-4430 (Arkay®); ² Valores de referência para os parâmetros sanguíneos disponibilizados pelo aparelho de medição BC-5000 Vet (Mindray®).

A presença de anemia, trombocitopénia, neutropénia, elevação dos parâmetros ALT, ALP e creatinina foram, apenas, considerados efeitos secundários quando a sua gravidade tenha aumentado após a administração da quimioimunoterapia, e deste modo existir uma relação de casualidade com a administração da quimioimunoterapia. Para tal, quando se verificou este aumento, considerou-se como limite inferior para o cálculo do grau de toxicidade, os valores observados nas análises anteriores à quimioimunoterapia.

2.7 Análise estatística

A análise estatística consistiu na análise descritiva geral das variáveis espécie, género, idade ao diagnóstico, tipo de neoplasia, exames complementares de diagnóstico, classificação histológica, localização das neoplasias, estadiamento clínico, terapêutica, efeitos secundários durante a quimioimunoterapia e resposta clínica.

Todos os dados reunidos foram registados e analisados estatisticamente com recurso a um programa informático, nomeadamente o Microsoft Office 365® Excel: Windows 10, versão 1708.

3 Resultados

3.1 Caracterização da amostra

Mediante os critérios de seleção estabelecidos anteriormente, foram incluídos no estudo 20 animais com doença neoplásica e, que realizaram quimioimunoterapia – imunoterapia APAVAC® associada a QC ou QM. Da amostra inicial (n=20), 8 são gatos (40%) e, 12 são cães (60%).

3.1.1 Caracterização da amostra quanto ao gênero

Quanto ao gênero, 75% (15/20) dos animais pertencem ao gênero feminino e, 25% (5/20) ao gênero masculino. Da amostra de gatos, 12,5% (1/8) são machos e 87,5% (7/8) são fêmeas. Por outro lado, da amostra de cães, 33% (4/12) são machos e 67% (8/12) são fêmeas.

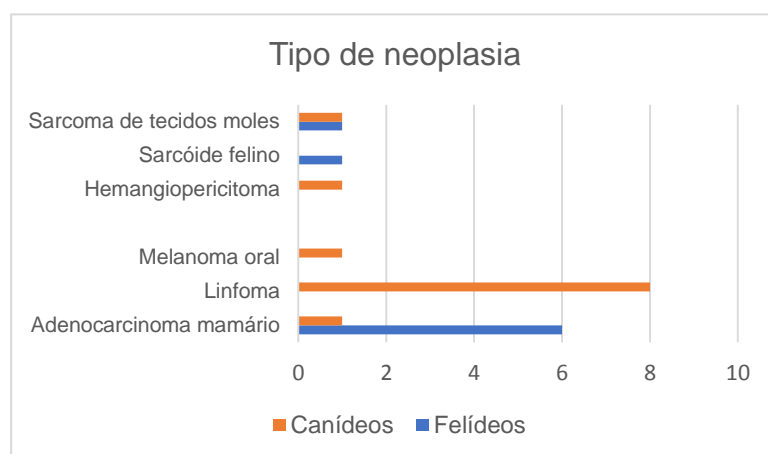
3.1.2 Caracterização da amostra quanto à idade ao diagnóstico

A idade ao diagnóstico dos animais em estudo variou entre os 4 e os 17 anos de idade. As idades média e mediana dos animais em estudo foram de 9,35 e 9,5 anos, respetivamente, com desvio padrão de 3,9. Na amostra de gatos, as idades média e mediana, ao diagnóstico, foram de 11,25 e 11 anos, respetivamente, com desvio padrão de 2,8. Por outro lado, na amostra de cães, as idades média e mediana, ao diagnóstico, foram de 8,1 e 7 anos, respetivamente, com desvio padrão de 3,9.

3.1.3 Caracterização da amostra quanto ao tipo de neoplasia

A administração da imunoterapia APAVAC® foi realizada em vários tipos de neoplasia, nomeadamente adenocarcinoma mamário em gatas (n=6) e cadelas (metástases; n=1), linfoma em cães (n=8), melanoma oral em cães (n=1), fibrossarcoma em gatos (n=1), hemangiopericitoma em cães (n=1), sarcóide felino (n=1) e, sarcoma de tecidos moles em cães (n=1).

Figura 12: Distribuição do tipo de neoplasia nos grupos de canídeos e felídeos.



3.2 Exames complementares de diagnóstico

A biópsia e a análise histopatológica foram os exames complementares de eleição para o diagnóstico citológico, na totalidade dos animais em estudo (20/20). Em 87,5% (7/8) dos casos de linfoma canino optou-se, ainda, pela realização de imunofenotipagem, de modo a caracterizar o tipo de linfoma (de células B ou T). Para a imunomarcação das células T e B, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica na maioria dos animais (7/8), realizando-se, ainda, em 43% (3/7) dos cães com linfoma a citometria de fluxo. Desta análise, a maioria dos animais foram diagnosticados com linfoma de células B (n=6), existindo apenas um linfoma de células T (doente 12).

Figura 13: Descrição dos exames complementares de diagnóstico efetuados no linfoma canino.

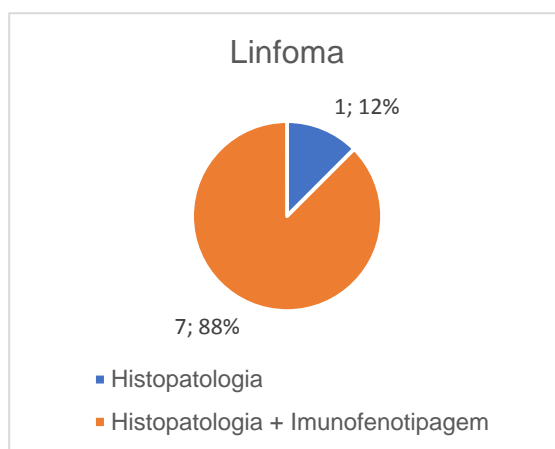
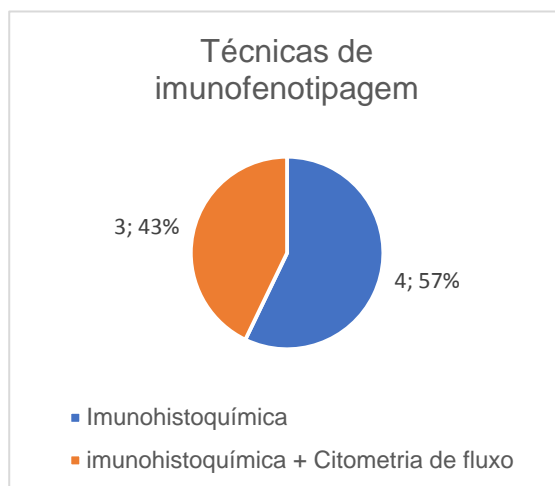


Figura 14: Descrição das técnicas de imunofenotipagem efetuadas no linfoma canino.



3.3 Classificação histológica e localização das neoplasias

No grupo de canídeos (n=12) a neoplasia hematopoiética linfoma foi a mais frequente. No subgrupo de cães com linfoma (n=8), quanto à localização, 100% (8/8) dos cães apresentavam linfoma multicêntrico. Relativamente ao tipo histológico, 62,5% (5/8) apresentavam linfoma B difuso de células grandes (DLBCL), 12,5% (1/8) linfoma de Burkitt, 12,5% (1/8) linfoma B folicular e, 12,5% (1/8) linfoma indolente.

No caso referente às metástases de carcinoma mamário (doente 4), a análise histopatológica, realizada após mastectomia direita total, revelou a presença de um carcinoma mamário complexo túbulo-papilífero de grau I de malignidade. Relativamente à localização das metástases, foi efetuado um mapeamento de lesões que revelou um total de 24 lesões cutâneas. Deste estudo, definiram-se 4 lesões alvo (*target lesions*) com as seguintes localizações: retroauricular direita, abdômen direito, abdômen inguinal e proximal ao linfonodo poplíteo.

A análise histopatológica efetuada no doente 3 revelou um sarcoma de tecidos moles com baixo grau de malignidade. Relativamente à sua localização, a neoplasia encontrava-se localizada na hemiface direita, estendendo-se da zona rostral do nariz ao palato duro e canino superior direito.

As neoplasias melanoma oral (doente 2) e hemangiopericitoma (doente 1) apresentavam diagnóstico histopatológico, estando localizadas na bochecha esquerda e face lateral da coxa direita, respetivamente.

Nas neoplasias felinas (n=8), o adenocarcinoma mamário foi a neoplasia mais frequente. Relativamente ao tipo histológico do adenocarcinoma mamário (n=6), 66,7% (4/6) das gatas apresentavam adenocarcinoma mamário de grau III, 16,7% (1/6) apresentavam adenocarcinoma mamário simples de grau I e, 16,7% (1/6) apresentavam metástase nodal de carcinoma mamário. As localizações das neoplasias mamárias estão descritas na tabela 13.

Tabela 13: Localização das neoplasias no grupo de gatas com adenocarcinoma mamário.

| Tipo histológico | Localização |
|---------------------------------|---|
| Adenocarcinoma mamário grau III | Axila direita; mama D3; cadeia mamária esquerda; ambas as |

| | |
|--|-------------------------|
| (n=4) | cadeias mamárias |
| Recidiva de carcinoma mamário grau I (n=1) | Cadeia mamária esquerda |
| Metástase nodal de carcinoma mamário (n=1) | Axila esquerda |

Os casos de recidiva de fibrossarcoma (doente 13) e sarcóide felino (doente 14) apresentavam, igualmente, diagnóstico histopatológico, apresentando as seguintes localizações: parede costal e flanco direito; e comissura labial direita, respetivamente.

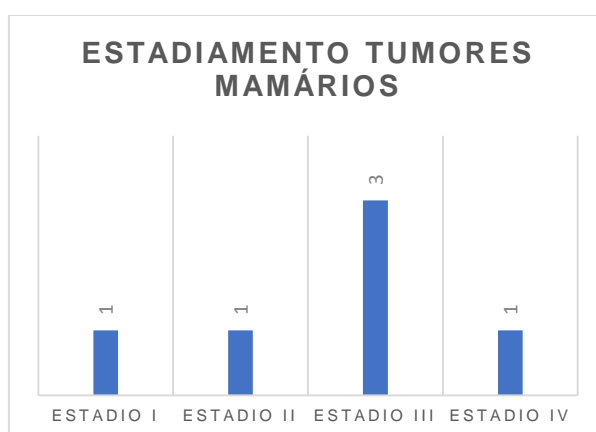
3.4 Estadiamento clínico

De acordo com a informação obtida através da realização do exame físico, exames ecográficos, citológicos (PAAF), raios-x e tomografia computadorizada, foi possível o estadiamento clínico, no momento do diagnóstico e, previamente à instituição do tratamento com quimioimunoterapia, em todos os animais em estudo [tabela 14].

3.4.1 Neoplasias felinas

Nas gatas com adenocarcinoma mamário, 16,7% (1/6) delas encontravam-se no estágio I (T1N0M0), 16,7% (1/6) no estágio II (T2N0M0), 50% (3/6) no estágio III (T1N1M0, T1N1M0, T3N0M0) e, 16,7% (1/6) no estágio IV (TNM1), esta última por revelar a presença de metástases pulmonares ao exame radiográfico [figura 15].

Figura 15: Distribuição dos estádios clínicos no grupo de gatas com adenocarcinoma mamário.



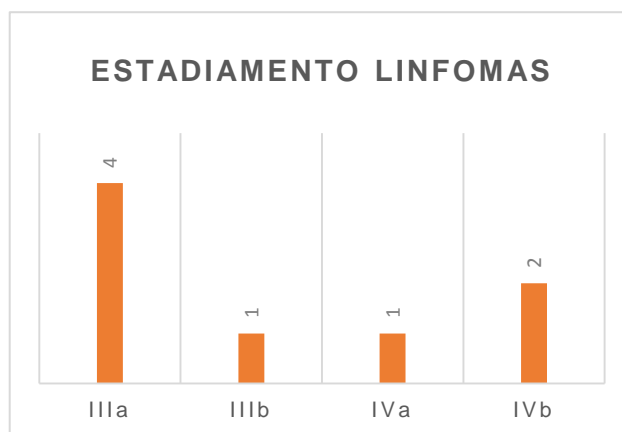
O doente 13, com fibrossarcoma, encontrava-se no estágio II da doença (T1bN0M0), por apresentar um tumor primário profundo com diâmetro inferior a 5 centímetros e, não evidenciar linfadenomegalias, nem metastização orgânica abdominal ou torácica, no exame tomográfico.

O gato com sarcóide felino (doente 14) encontrava-se no estágio T3N0M0, pelo tumor primário apresentar um diâmetro superior a 5 centímetros e, não evidenciar linfadenomegalias, nem metastização à distância.

3.4.2 Neoplasias caninas

No linfoma canino, 50% (4/8) dos animais encontravam-se no estágio IIIa, 12,5% (1/8) no estágio IIIb, 12,5% (1/8) no estágio IVa e, 25% (2/8) no estágio IVb [figura 16].

Figura 16: Distribuição dos estádios clínicos no linfoma canino.



O doente com hemangiopericitoma (doente 1) encontrava-se no estágio II (T1aN0M0) da doença, por apresentar um tumor primário com um diâmetro inferior a 5 centímetros e, não evidenciar linfadenomegalias, nem metastização à distância. Por outro lado, o doente com sarcoma de tecidos moles encontrava-se no estágio III (T2bN0M0) da doença, por apresentar um tumor primário com um diâmetro superior a 5 centímetros e por evidenciar, ao exame tomográfico, destruição óssea e invasão das estruturas vizinhas.

O cão com melanoma oral (doente 2) encontrava-se no estágio IV (T3N1M0) da doença, por apresentar um tumor primário com um diâmetro superior a 4 centímetros e, por evidenciar metástase ganglionar no linfonodo submandibular ipsilateral à lesão, no exame citológico.

O doente 4, diagnosticado com metástases de carcinoma mamário, encontrava-se no estágio V da doença, por apresentar múltiplas metástases cutâneas do carcinoma mamário previamente extirpado.

Tabela 14: Descrição dos estádios clínicos, segundo a OMS/WHO, em cada um dos animais em estudo, no grupo de canídeos e felídeos.

| Cães | Estadiamento clínico | Gatos | Estadiamento clínico |
|------|-----------------------|-------|----------------------|
| 1 | Estádio II (T1aN0M0) | 13 | Estádio II (T1bN0M0) |
| 2 | Estádio IV (T3N1M0) | 14 | T3N0M0 |
| 3 | Estádio III (T2bN0M0) | 15 | Estádio III (T1N1M0) |
| 4 | Estádio V | 16 | Estádio I (T1N0M0) |
| 5 | Estádio IIIb | 17 | Estádio II (T2N0M0) |

| | |
|----|--------------|
| 6 | Estádio IVa |
| 7 | Estádio IVb |
| 8 | Estádio IIIa |
| 9 | Estádio IIIa |
| 10 | Estádio IIIa |
| 11 | Estádio IIIa |
| 12 | Estádio IVb |

| | |
|----|----------------------|
| 18 | Estádio III (T1N1M0) |
| 19 | Estádio III (T3N0M0) |
| 20 | Estádio IV (TNM1) |

3.5 Terapêutica

3.5.1 Cirurgia

A cirurgia citoredutora foi realizada previamente à instituição do protocolo com quimioimunoterapia em 8 dos 20 animais em estudo.

3.5.1.1 Neoplasias felinas

Nas gatas com adenocarcinoma mamário, a totalidade (6/6) dos animais foram submetidos a cirurgia citoredutora, previamente ao começo da quimioimunoterapia. Em 66,7% (4/6) das gatas intervencionadas, foi realizada mastectomia total das cadeias mamárias (esquerda e direita). Nas restantes gatas (2/6) a abordagem cirúrgica adotada foi diferente, não só pela preferência dos tutores, bem como pela progressão da doença. Numa das gatas foram realizadas nodulectomias sucessivas de lesões na cadeia mamária direita e, posteriormente, revisão cirúrgica com o objetivo de aumentar as margens cirúrgicas do tumor. Na outra gata foi realizada mastectomia da cadeia mamária direita e, mais tarde, nodulectomia axilar direita.

No gato com fibrossarcoma não operável (doente 13) não se procedeu à sua excisão, tendo-se optado pela realização de biópsia, que visava a emissão de um diagnóstico definitivo e a obtenção de material para preparação da imunoterapia APAVAC®. Com o igual propósito, procedeu-se à realização de biópsia no gato com sarcóide felino (doente 14), pois as várias terapêuticas anteriormente instituídas, inclusivamente a cirurgia convencional, a criocirurgia e a aplicação de “Imiquimod”, não promoveram a remissão completa da lesão.

3.5.1.2 Neoplasias caninas

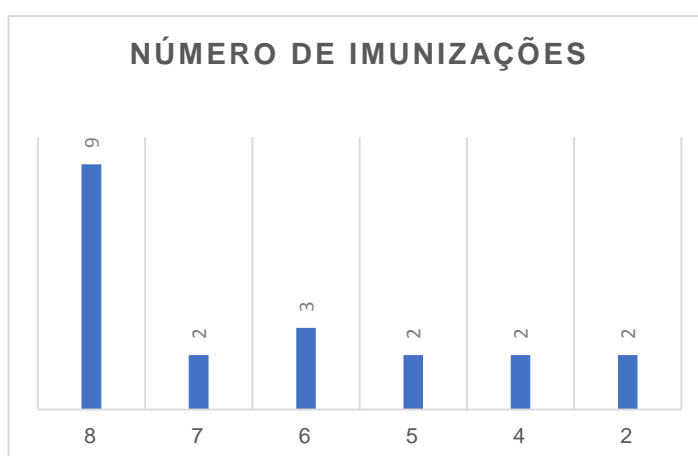
No grupo das neoplasias caninas (n=12), apenas 2 dos animais (melanoma oral e recidiva de hemangiopericitoma) realizaram cirurgia citoredutora previamente à quimioimunoterapia.

3.5.2 Quimioimunoterapia

Dos animais imunizados, 45% (9/20) receberam 8 imunizações, 10% (2/20) receberam 7 imunizações, 15% (3/20) receberam 6 imunizações, 10% (2/20) receberam 5 imunizações, 10% (2/20) receberam 4 imunizações e, 10% (2/20) receberam 2 imunizações com a vacina APAVAC®.

No momento da análise de dados, dois dos animais (doentes 17 e 18) encontravam-se no decorrer do protocolo vacinal, tendo sido administrado, até esse momento, 7 imunizações, em cada um deles.

Figura 17: Caracterização do número de imunizações com a vacina APAVAC[®], efetuadas no decorrer da quimioimunoterapia.



3.5.2.1 Neoplasias felinas

No grupo das neoplasias felinas, a maioria dos animais (7/8) foram submetidos à administração de QM (ciclofosfamida e meloxicam), durante 6 meses.

A suspensão da QM foi realizada em dois dos gatos (2/8). No doente 15, a suspensão da terapêutica foi consequência do desenvolvimento de infecções urinárias recorrentes por *Escherichia coli*, bem como da administração sistemática de antibióticos. No doente 20, a cessação da QM foi consequência do desenvolvimento de infecções urinárias recorrentes, valores de creatinina elevados e, mais tarde, sinais clínicos e radiográficos compatíveis com pneumonia e/ou infiltração neoplásica.

Em relação à imunoterapia APAVAC[®], 37,5% (3/8) dos gatos concluíram o protocolo vacinal. Os restantes animais foram imunizados com 5 (1/8), 6 (1/8), 7 (2/8) e 2 (1/8) doses vacinais.

3.5.2.2 Neoplasias caninas

A QM foi instituída em 33% (4/12) dos animais com neoplasias caninas, nomeadamente, hemangiopericitoma, melanoma oral, sarcoma de tecidos moles e metástases de carcinoma mamário.

O protocolo CHOP foi instituído na totalidade dos animais com a neoplasia linfoma (doentes 5 a 12).

Em relação à imunoterapia APAVAC[®], 50% (6/12) dos cães concluíram o protocolo vacinal. Os restantes animais foram imunizados com 7 (1/12), 6 (1/12), 5 (1/12), 4 (2/12) e 2 (1/12) doses vacinais.

No decorrer da imunoterapia, em 2 dos animais submetidos ao protocolo CHOP, existiu a necessidade de alteração do protocolo quimioterápico.

No doente 8, houve a necessidade de substituir a ciclofosfamida por clorambucil (0,2 mg/Kg, PO, em esquema contínuo), devido à ocorrência de reações adversas face à administração do primeiro fármaco quimioterápico, nomeadamente, hematemese e hematoquézia. No decorrer da imunoterapia, o doente 8 saiu de remissão três vezes, pelo que a re-indução se baseou na administração de lomustina (60-90 mg/m², IV, a cada 3-4 semanas), L-CHOP (L-asparaginase associada ao protocolo CHOP) e, por último, citarabina (150-300 mg/m², IV, durante 3-5 dias) em associação com a dexametasona. No protocolo L-CHOP, para além da administração de L-asparaginase (400 UI/Kg, SC, com dose total máxima de 10000 UI), houve necessidade de substituir a doxorrubicina por mitoxantrona (6 mg/m², IV, a cada 21 dias).

O doente 12 saiu de remissão duas vezes. Na primeira, a re-indução e a manutenção, foram conseguidas pela administração de L-asparaginase e lomustina, respetivamente. Na segunda re-indução, procedeu-se à administração de dacarbazina (200 mg/m², IV), durante 5 dias consecutivos.

3.6 Avaliação dos efeitos secundários durante a quimioimunoterapia

Após a análise de dados, verificou-se a ocorrência de efeitos secundários, durante a quimioimunoterapia, em 70% dos animais (14/20) em estudo, concretamente em 4 dos 8 gatos e, em 10 dos 12 cães.

Tabela 15: Efeitos secundários à quimioimunoterapia. Frequência absoluta e relativa, nos grupos de canídeos e felídeos.

| Efeitos Secundários | Frequência absoluta (n) | Frequência relativa (%) | Canídeos | Felídeos |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|----------|
| Reações imuno-alérgicas | 3 | 6% | 3 | 0 |
| Alterações no local de administração | 1 | 2% | 1 | 0 |
| Toxicidade gastrointestinal | 21 | 42% | 17 | 4 |
| Toxicidade renal | 2 | 4% | 1 | 1 |
| Toxicidade hepática | 6 | 12% | 6 | 0 |
| Toxicidade hematopoiética | 17 | 34% | 14 | 3 |
| Total | 50 | 100% | 42 | 8 |

Durante a quimioimunoterapia foi registrada a ocorrência de 50 episódios de eventos adversos, 84,0% nos cães e, 16,0% nos gatos. Dos efeitos secundários observados, a maioria correspondeu a toxicidade gastrointestinal (42%; 21/50), seguida da toxicidade hematopoiética (34%; 17/50), toxicidade hepática (12%; 6/50), reações imuno-alérgicas (6%; 3/50), toxicidade renal (4%; 2/50), e, em menor percentagem, reações adversas no local de administração (2%; 1/50).

Dos animais submetidos a QM (11/20), foram observados os efeitos secundários toxicidade gastrointestinal (6/50), hematopoiética (3/50) e renal (1/50).

Dos animais submetidos à QC (9/20), foram observados os efeitos secundários toxicidade gastrointestinal (15/50), hematopoiética (14/50), renal (1/50), hepática (6/50), reações imuno-alérgicas (3/50) e alterações no local de administração (1/50).

A frequência dos efeitos secundários observados, foi superior nos cães, para todas as categorias mencionadas, com exceção da toxicidade renal, na qual se observou igual frequência em ambos os grupos de animais. Além disso, nos gatos, constatou-se a ausência de toxicidade hepática, reações imuno-alérgicas, bem como reações adversas no local de administração.

Na tabela 16 está representada a classificação dos efeitos secundários relativamente à sua gravidade, no decorrer da quimioimunoterapia e, de acordo com VCOG-CTCAE (2011).

Tabela 16: Classificação dos efeitos secundário relativamente à sua gravidade e, respetiva frequência absoluta, de acordo com VCOG-CTCAE (2011).

| Efeitos secundários | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 | Grau 4 | Grau 5 |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Reações imuno-alérgicas | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Alterações no local de administração | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Toxicidade gastrointestinal | 13 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| Toxicidade renal | 1 | 1 | 0 | 0 | - |
| Toxicidade hepática | 0 | 4 | 2 | 0 | - |
| Toxicidade hematopoiética | 6 | 6 | 2 | 3 | 0 |
| Total | 21 | 21 | 4 | 3 | 1 |

Legenda: -, não existe a classificação de grau 5.

Da análise de dados, a maioria dos efeitos secundários observados foram classificados, de acordo com a gravidade (VCOG-CTCAE), em grau 1 (42%; 21/50) e grau 2 (42%; 21/50). Os

restantes graus (3 a 5) foram observados em 8% (4/50), 6% (3/50) e 2% (1/50) dos episódios registados, respetivamente. Relativamente à toxicidade gastrointestinal, os efeitos secundários foram de grau 1 e 2. Nas reações imuno-alérgicas, os efeitos secundários foram de grau 1 (1/3), grau 2 (1/3) e grau 5 (1/3). No local de administração, foi apenas observado o efeito secundário edema, classificado, por isso, em grau 2. Em relação à toxicidade renal, os efeitos secundários observados foram de grau 1 (1/2) e grau 2 (1/2). Na toxicidade hepática, os efeitos adversos observados foram de grau 2 (4/6) e grau 3 (2/6). Por último, relativamente à toxicidade hematopoiética, observaram-se efeitos secundários de grau 1 (6/17), grau 2 (6/17), grau 3 (2/17) e grau 4 (3/17).

3.6.1 Reações imuno-alérgicas

Os efeitos secundários relacionados com reações imuno-alérgicas foram observados em 3 dos animais em estudo (doentes 5, 11 e 12).

No doente 5, no decorrer da quimioimunoterapia, foi observada uma reação alérgica e/ou de hipersensibilidade cutânea, localizada na região cervical, dorso-lombar e membro posterior esquerdo. O padrão lesional caracterizou-se pela existência de prurido, múltiplas lesões papulares, hiperémicas, assemelhando-se, por isso, a um fenómeno de urticária. Com efeito, relativamente à sua gravidade, e de acordo com os critérios VCOG-CTCAE (2011), o efeito secundário foi de grau 2.

No doente 11, no decorrer da quimioimunoterapia, foi observado um conjunto de sinais clínicos compatíveis com uma reação autoimune, cujo desfecho culminou com a morte do animal, sendo, por isso, um efeito secundário de grau 5, tendo em conta a sua gravidade e, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011). Os sinais clínicos observados incluíram alterações neurológicas, motoras, ataxia, perda de equilíbrio, dificuldade em subir e descer escadas, diarreia, polaquiúria, anorexia, edema da córnea e conjuntiva, dispneia, convulsões e, por último, o sinal laboratorial leucopénia.

No doente 12, os tutores referiram o aumento das dimensões dos linfonodos superficiais, imediatamente após a administração da imunoterapia, não tendo sido necessária qualquer terapêutica de suporte. Tendo em conta a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-CTCAE (2011), o efeito secundário foi de grau 1.

3.6.2 Alterações no local de administração

Os efeitos secundários relacionados com o local de administração foram observados apenas num dos doentes da amostra em estudo. No doente 7, 24h após a administração da 3ª imunização com a vacina APAVAC®, foi observado edema moderado no local de administração, sendo, por isso, um efeito secundário de grau 2, tendo em conta a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-CTCAE (2011).

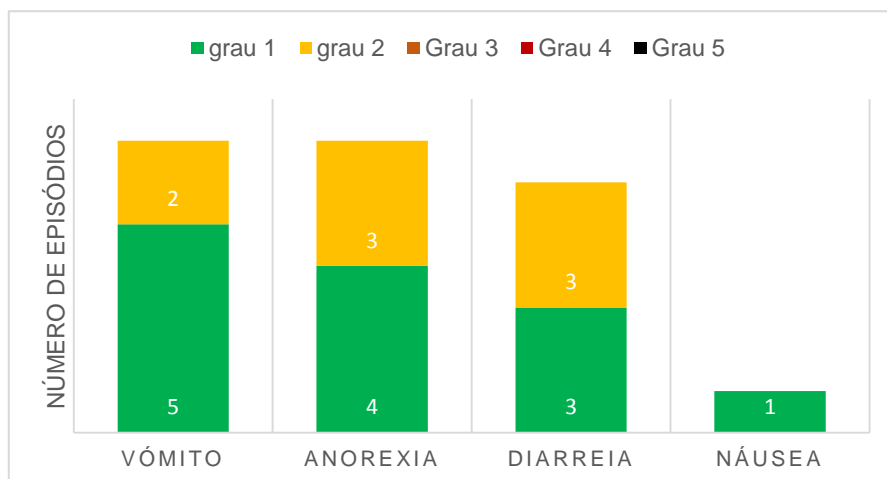
3.6.3 Toxicidade gastrointestinal

Os episódios relacionados com a toxicidade gastrointestinal foram observados em 42% (21/50) dos episódios registados, apresentando-se como o efeito secundário mais frequente na amostra em estudo. Os episódios foram classificados de acordo com os sinais clínicos identificados e, incluíram o vômito (7/21), a anorexia (7/21), a diarreia (6/21) e a náusea (1/21). A classificação consoante a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-

Figura 18: Classificação dos episódios gastrointestinais quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011).

CTCAE,

está



apresentada na figura 18.

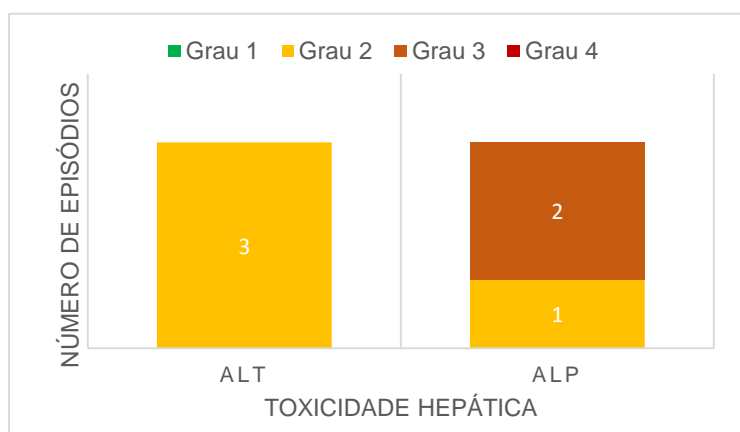
3.6.4 Toxicidade renal

Os episódios relacionados com a toxicidade renal foram observados em 4% (2/50) dos episódios registados. Relativamente ao parâmetro sanguíneo creatinina, os episódios foram classificados de acordo com os sinais laboratoriais identificados, considerando-se um efeito adverso quando o seu valor foi superior aos valores de referência estipulados [tabela 12]. A classificação consoante a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-CTCAE, foi de grau 1 e grau 2, no grupo de canídeos e felídeos, respetivamente.

3.6.5 Toxicidade hepática

Os episódios relacionados com a toxicidade hepática foram observados em 12% (6/50) dos episódios registados. Relativamente aos parâmetros sanguíneos ALT e ALP, os episódios foram classificados de acordo com os sinais laboratoriais identificados, considerando-se um efeito adverso quando o seu valor foi superior aos valores de referência estipulados [tabela 12]. A classificação consoante a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-CTCAE, encontra-se apresentada na figura 19.

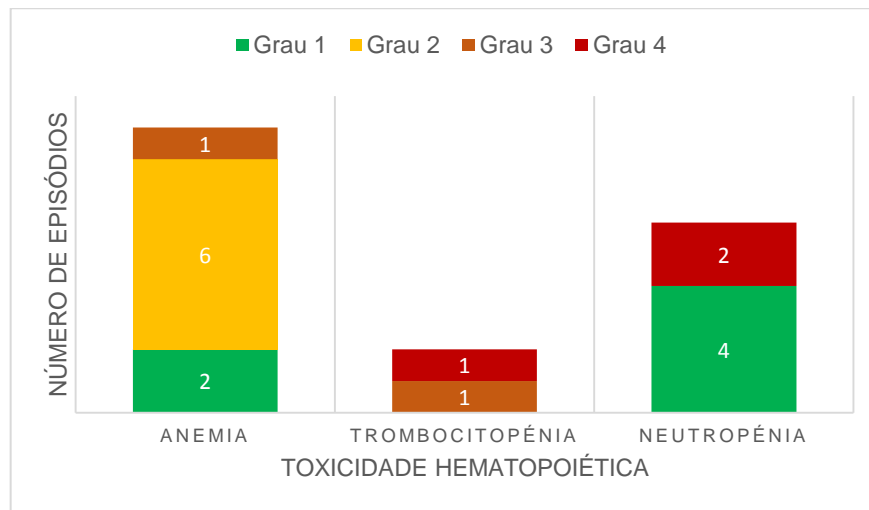
Figura 19: Classificação da toxicidade hepática quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011).



3.6.6 Toxicidade hematopoiética

Os episódios relacionados com a toxicidade hematopoiética foram observados em 34% (17/50) dos episódios registados, apresentando-se como o 2º efeito secundário mais frequente na amostra em estudo. Relativamente aos parâmetros sanguíneos hematócrito, plaquetas e neutrófilos, os episódios foram classificados de acordo com os sinais laboratoriais identificados, considerando-se um efeito adverso quando o seu valor foi inferior aos valores de referência estipulados [tabela 12]. O sinal laboratorial anemia foi observado em 2 gatos e 7 cães; a trombocitopenia em 2 cães; e a neutropenia em 1 gato e 5 cães. A classificação consoante a sua gravidade e, de acordo com os critérios VCOG-CTCAE, está apresentada na figura 20.

Figura 20: Classificação da toxicidade hematopoiética quanto à sua gravidade, de acordo com VCOG-CTCAE (2011).



3.7 Resposta clínica

3.7.1 Neoplasias caninas

Dos 12 cães em estudo, 4 (33,3%) estavam vivos no momento da análise de dados. No entanto, 41,7% (5/12) dos cães foram eutanasiados devido a doença progressiva. Os restantes animais (n=3) foram eutanasiados devido a complicações ou efeitos secundários à quimioimunoterapia e, que de algum modo diminuíram a sua qualidade de vida.

3.7.1.1 Linfoma

Relativamente ao linfoma canino, 87,5% (7/8) dos cães iniciaram a imunoterapia em remissão completa. No entanto, 12,5% (n=1/8) dos animais estavam em remissão parcial no começo da imunoterapia.

Dos animais que iniciaram a imunoterapia em remissão completa (n=7), 2 mantiveram-se em remissão completa e, 5 saíram de remissão durante o protocolo vacinal com a vacina APAVAC®. Dos cães que saíram de remissão durante a imunoterapia (n=5), 60% (3/5) saíram de remissão apenas uma vez, 20% (1/5) duas vezes e, 20% (1/5) dos animais saíram de remissão três vezes. Destes animais, 20% (1/5) saíram de remissão após a 1ª imunização; 20% (1/5) após a 2ª imunização; 40% (2/5) após a 6ª imunização; e 20% (1/5) após a 7ª imunização.

Portanto, dos cães imunizados para o linfoma (n=8), 25% (2/8) mantiveram-se em remissão completa durante a imunoterapia, 62,5% (5/8) saíram de remissão e, 12,5% (1/8) mantiveram doença estável durante o protocolo vacinal.

No momento da análise de dados, 37,5% (3/8) estavam vivos, 37,5% (3/8) foram eutanasiados devido a doença progressiva e 25% (2/8) foram eutanasiados devido a causas não relacionadas com o linfoma (doentes 11 e 6). O doente 11 desenvolveu sinais clínicos compatíveis com uma reação autoimune e, o doente 6 desenvolveu uma pancreatite fulminante, secundariamente à administração do fármaco citotóxico L-asparaginase.

3.7.1.2 Outras neoplasias

Dos 4 animais diagnosticados com outras neoplasias (doentes 1 a 4), apenas 1 (25%) estava vivo no momento da análise de dados.

No doente com hemangiopericitoma, a neoplasia reapareceu com a mesma localização, 4 meses após a conclusão do protocolo vacinal com a imunoterapia APAVAC®.

Nos doentes com sarcoma de tecidos moles (doente 3) e metástases de carcinoma mamário (doente 4), as lesões iniciais aumentaram de dimensões no decurso da quimioimunoterapia, constatando-se, no doente 4, o aparecimento de novas lesões cutâneas e, no doente 3, a evidência de metastização no gânglio ipsilateral à lesão, 1 mês após iniciar a imunoterapia.

Um quarto dos animais (25%) manteve-se em remissão completa durante a quimioimunoterapia (doente 1) e, metade (2/4) dos animais foram eutanasiados devido a doença progressiva. O doente com melanoma oral (doente 2) foi eutanasiado como consequência da degradação do seu estado geral.

3.7.2 Neoplasias felinas

Dos 8 gatos em estudo, 3 (37,5%) estavam vivos no momento da análise de dados, e dois encontravam-se no decorrer da quimioimunoterapia, tendo ambos realizado até esse momento 7 imunizações. Durante a quimioimunoterapia, 62,5% (5/8) dos gatos foram eutanasiados devido a doença progressiva, por complicações e/ou aparecimento de lesões metastáticas.

3.7.2.1 Adenocarcinoma mamário

Neste grupo, metade (3/6) das gatas em estudo estavam vivas no momento da análise de dados.

Durante a quimioimunoterapia, metade das gatas (3/6) foram eutanasiados devido a doença progressiva e, outra metade (3/6) das gatas mantiveram-se em remissão completa da doença, sem recidiva local do tumor mamário nem evidência de metastização.

As gatas eutanasiadas manifestaram sinais clínicos variados, nomeadamente, dispneia e efusão pleural (doentes 15 e 20), bem como alterações do forro neurológico (doente 19), principalmente mobilidade reduzida, dor à palpação da coluna vertebral, *circling*, *head-tilt* e anisocoria.

No decorrer da quimioimunoterapia, o doente 15 evidenciou o aparecimento de novas lesões miliares, com crescimento lento e localizadas na região torácica direita.

No doente 20, cujo estadiamento clínico evidenciou a existência de metastização pulmonar previamente à instituição da quimioimunoterapia (estádio IV), foi verificado o crescimento de novos nódulos mamários, mediastínicos, bem como consolidação pulmonar.

No decorrer da quimioimunoterapia, foi observado o desenvolvimento de metastização pulmonar em 33,3% (2/6) da amostra em estudo e, uma das gatas (1/6) desenvolveu

metástases no sistema nervoso central, nomeadamente cerebrais, evidenciadas pelo exame tomográfico.

3.7.2.2 Outras neoplasias

Nos doentes 13 e 14, diagnosticados com fibrossarcoma e sarcóide felino, respetivamente, foi observado o aumento progressivo das lesões durante a quimioimunoterapia. Ambos foram eutanasiados por apresentarem doença progressiva, tendo desenvolvido metástases pulmonares (doente 13) e nos linfonodos ipsilaterais à lesão (doente 14). A metastização ganglionar foi detetada 7 meses após a conclusão da imunoterapia.

4 Discussão

4.1 Caracterização da amostra

No estudo foram incluídos todos os animais que realizaram a imunoterapia APAVAC®, independentemente do tipo de neoplasia, estadiamento clínico, exames complementares de diagnóstico e do protocolo de quimioterapia. A amostra era constituída por 20 animais, 12 cães e 8 gatos, correspondendo 75% (15/20) ao género feminino e 25% (5/20) ao género masculino.

A idade, ao diagnóstico, dos animais em estudo variou entre os 4 e os 17 anos de idade. No grupo de felídeos, as idades média e mediana foram superiores à do grupo de canídeos (média 11,25 anos; mediana 11 anos vs. média 8,1 anos; mediana 7 anos). Tal pode ser explicado pela maior esperança média de vida nos gatos ou pelo aparecimento tardio de neoplasias nesta espécie. Por outro lado, a amostra constituída por cães foi representada maioritariamente pelo linfoma canino (8/12), com idades ao diagnóstico inferiores às restantes neoplasias representadas na amostra em estudo. De fato, o linfoma em cães apresenta maior incidência em cães com idade média compreendida entre os 6 e os 9 anos de idade (Vail et al., 2013).

No estudo realizado, as neoplasias com maior representatividade foram o linfoma em cães e, o adenocarcinoma mamário em gatas [40% (8/20) vs. 30% (6/20)]. As restantes neoplasias (melanoma oral, fibrossarcoma, hemangiopericitoma, sarcóide felino, sarcoma de tecidos moles e metástases cutâneas de carcinoma mamário) apresentaram uma frequência absoluta inferior, representando uma amostra heterógena de neoplasias e, correspondendo a 30% (6/20) da amostra em estudo. A vacina APAVAC® foi administrada nos doentes com linfoma canino, pois existem estudos a comprovar a eficácia clínica da sua administração em cães com DLBCL e linfoma indolente (Marconato et al., 2014; Marconato et al., 2015). Por outro lado, nas restantes neoplasias, a sua escolha teve em conta a agressividade das neoplasias e a disponibilidade financeira dos tutores.

No linfoma em cães, a totalidade (8/8) dos animais apresentava linfoma multicêntrico, a localização mais comum nesta neoplasia. Esses resultados vão ao encontro dos estudos realizados em linfoma canino, nos quais 84% dos cães desenvolveram a forma

multicêntrica, normalmente caracterizada por linfadenomegália superficial (Vail et al., 2013). Em relação à morfologia celular e à classificação histopatológica, a maioria (5/8) dos cães apresentava linfoma B difuso de células grandes (DLBCL). Novamente, os resultados obtidos revelaram o esperado, uma vez que o DLBCL é o tipo histológico mais comum no linfoma canino (Ponce et al., 2010). No entanto, considerando o número reduzido de animais em estudo, não se pode descartar a hipótese dos resultados obtidos se deverem ao acaso. Tendo por base a classificação da OMS/WHO no que diz respeito ao linfoma canino, os tipos histológicos presentes na amostra em estudo (DLBCL, linfoma indolente e linfoma de Burkitt) são subtipos do linfoma de células B (Vail et al., 2013). A imunofenotipagem do linfoma foi efetuada na maioria (7/8) dos animais, tendo-se diagnosticado linfoma de células B na maioria (6/7) dos animais em estudo. No entanto, os resultados obtidos revelaram a presença de linfoma de células T em 14,3% (1/7) dos animais (doente 12). O doente 12 foi diagnosticado com DLBCL, um subtipo de linfoma de células B, mediante o resultado histopatológico e a caracterização morfológica das células neoplásicas. Nesse doente, a imunofenotipagem, baseada na técnica de imunohistoquímica, foi realizada durante a terapêutica com quimioimunoterapia, na tentativa de confirmar a classificação morfo-histológica anteriormente emitida. O resultado da imunofenotipagem revelou a presença de 95% de células T e 5% de células B, concluindo-se, por isso, a presença de linfoma de células T. Com base no resultado emitido, foi efetuada a suspensão da imunoterapia APAVAC®, por existirem interações medicamentosas quando são administrados concomitantemente os fármacos citotóxicos L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida e/ou metotrexato, especialmente na terapêutica de animais com linfoma de células T, potenciando, assim, a ocorrência de meningoencefalite autoimune (Urodelia, 2018). O desfecho, observado no doente 12, revela a importância da classificação dos diferentes subtipos de linfoma, que deve ser baseada não só nas características morfológicas das células neoplásicas (histopatologia), como também na imunofenotipagem (células B ou T) e, nas características genéticas, moleculares e clínicas da neoplasia (Seelig, Avery, Ehrhart, & Linden, 2016).

O estadiamento clínico foi estabelecido na totalidade (20/20) dos animais em estudo, baseando-se nos sistemas de classificação definidos pela OMS/WHO.

No começo da quimioimunoterapia, 15% (3/20) dos animais em estudo apresentavam evidência de metastização ganglionar ou à distância (doentes 2, 4 e 20), daí a sua classificação em estádios mais avançados da doença (estádio IV e estágio V). O doente 2 apresentava metastização no gânglio ipsilateral à lesão; o doente 4, apresentava 24 metástases cutâneas de carcinoma mamário; e o doente 20 apresentava metastização pulmonar. Nas restantes neoplasias sólidas, não foi possível eliminar com exatidão a presença de metastização à distância (tórax/abdômen), pois a sensibilidade do exame radiográfico e ecográfico não é perfeita, no que diz respeito à detecção de micrometástases.

Como alternativa, o exame tomográfico ter-se-ia revelado a melhor opção para a pesquisa de micrometástases à distância e o envolvimento dos gânglios linfáticos, devido à maior definição de imagem e à sua maior sensibilidade (Dobson & Lascelles, 2011), comparativamente aos outros exames imagiológicos.

4.2 Químioimunoterapia

A imunoterapia APAVAC® foi associada à QC ou QM, na maioria (19/20) da amostra em estudo. Da análise de dados, 45% (9/20) dos animais realizaram 8 imunizações, concluindo, assim, o protocolo vacinal; 80% (16/20) realizaram mais de 4 imunizações; e 20% (4/20) realizaram 4 ou menos imunizações. Logo, na amostra em estudo, 55% (11/20) dos animais não concluíram o protocolo vacinal com a imunoterapia APAVAC®.

A QM foi associada à imunoterapia em 55% (11/20) dos animais: 87,5% (7/8) em gatos e 33,3% (4/12) em cães. A QM foi instituída nestes animais devido aos seus efeitos anti-tumorais e imunomoduladores: (1) inibição da angiogénese e vasculogénese tumorais (Gaspar et al., 2018; Pasquier et al., 2010), (2) erradicação e disfunção das células iniciadoras de tumores (Loven et al., 2013), (3) indução da dormência tumoral (André et al., 2014), e (4) reversão da imunotolerância gerada pelo próprio tumor, através da depleção de células Treg e do aperfeiçoamento das funções das células T efectoras e dendríticas, promovendo, por isso, uma melhor apresentação dos antígenos tumorais (Madondo et al., 2016). Este último efeito assume especial importância no contexto da imunoterapia anti-tumoral, visto que a resposta anti-tumoral produzida pela vacina APAVAC® depende da apresentação antigénica e da resposta T celular dirigida aos antígenos tumorais.

A administração de QM está indicada após a citoredução cirúrgica da neoplasia, com o objetivo de promover a destruição das células neoplásicas residuais ou eventuais micrometástases, prolongando, assim, o tempo de sobrevivência nesses animais (Loven et al., 2013). Neste contexto, a QM foi instituída em 40% (8/20) dos animais em estudo. Por outro lado, esta modalidade terapêutica pode ser, igualmente, utilizada como terapia de manutenção, com a intenção de melhorar a qualidade de vida nos doentes oncológicos (Loven et al., 2013), sendo, instituída, neste contexto, em 15% (3/20) dos animais em estudo.

Os inibidores dos recetores da tirosina-quinase apresentam atividade anti-angiogénica, bem como atividade anti-tumoral em várias neoplasias sólidas, nomeadamente, sarcomas e carcinomas metastáticos (London et al., 2012; London et al., 2009), daí a sua utilização no doente com sarcoma de tecidos moles (doente 3).

No presente estudo, a QM teve a duração de 6 meses, por se considerar o tempo necessário para o aparecimento de lesões metastáticas detetáveis aos exames imagiológicos.

Para além dos seus efeitos citotóxicos, a QC apresenta, igualmente, efeitos imunomoduladores (Hodge et al., 2012), podendo, por isso aperfeiçoar a resposta anti-

tumoral produzida pela vacina APAVAC®. Essas propriedades imunomodeladoras incluem a (1) modelação do fenótipo das células neoplásicas, (2) indução da “morte imunogénica” das células neoplásicas, (3) proliferação compensatória de células T tumor-específicas, como resposta à leucopénia induzida por certos fármacos citotóxicos e, (4) modelação das células Treg e MDSC (Hodge et al., 2012). No estudo realizado, a quimioterapia convencional (QC) foi associada à imunoterapia APAVAC®, em 45% (9/20) dos animais em estudo. Nesta modalidade terapêutica foram incluídos o protocolo CHOP (doentes 5 a 12) e a administração de epirrubicina (doente 4).

Por se considerar uma doença sistémica, a terapêutica do linfoma canino baseia-se na quimioterapia, tendo como principal objetivo alcançar a remissão completa da doença e melhores tempos de sobrevivência (Vail et al., 2013). Neste estudo, o protocolo terapêutico instituído nos cães com linfoma, baseou-se no protocolo CHOP, por se considerar o protocolo mais eficaz no tratamento de linfoma B agressivo, em cães (Simon et al., 2006; Vail et al., 2013). Apesar da quimioterapia de doses elevadas promover a remissão completa da doença, em alguns casos por longos períodos de tempo, as taxas de recidiva são altas (Marconato et al., 2014). Os estudos com a vacina APAVAC® demonstraram que a sua administração produz uma resposta imunitária anti-tumoral, permitindo, assim, o desenvolvimento de uma resposta imunitária de memória, nos animais com linfoma. O desenvolvimento dessa resposta providencia proteção duradoura e reatividade contra as células neoplásicas, atrasando e impedindo, por isso, a recidiva da doença (Marconato et al., 2014; Marconato et al., 2015), explicando, assim, a razão da administração da vacina APAVAC® nos cães com linfoma (n=8).

4.3 Avaliação dos efeitos secundários associados à quimioimunoterapia

Como todos os fármacos citotóxicos, o risco de ocorrência de efeitos secundários durante a quimioterapia está sempre presente. No estudo realizado, a percentagem de efeitos secundários à quimioimunoterapia, nos animais em estudo, foi de 70% (14/20). A existência de uma elevada frequência de efeitos secundários poderá ser explicada pelo estado clínico dos doentes e pela própria evolução da doença. Na realidade, na amostra em estudo verificou-se uma predominância (14/20) de animais em estágio avançado da doença (estádios III, IV e V), sobretudo no linfoma em cães.

Durante a quimioimunoterapia foi observada a toxicidade gastrointestinal (42%; 21/50), hematopoiética (34%; 17/50), hepática (12%; 6/50), reações imuno-alérgicas (6%; 3/50), toxicidade renal (4%; 2/50), e, por último, reações no local de administração (2%; 1/50). Na maioria dos animais, os efeitos secundários observados foram reversíveis após a administração de terapêutica de suporte.

Os efeitos secundários observados foram ligeiros a moderados, na maioria dos animais em estudo – 42% (21/50) dos efeitos secundários observados foram de grau 1 e 42% (21/50) de grau 2. A classificação de grau 3, 4 e 5 foi atribuída a 8% (4/50), 6% (3/50) e 2% (1/50) dos

episódios registrados, respetivamente. Os efeitos adversos com maior gravidade (grau 3, 4 e 5) foram atribuídos à elevação da ALP, anemia, trombocitopénia, neutropénia e suspeita de reação autoimune, tendo sido observados em cães com linfoma submetidos a protocolos de indução e resgate, bem como no protocolo terapêutico com o fármaco citotóxico epirrubicina.

No doente 12, os tutores referiram o aumento das dimensões dos linfonodos superficiais imediatamente após a administração das doses vacinais semanais. Surpreendentemente, este efeito adverso foi observado num doente, ao qual foi diagnosticado um linfoma de células T, tendo sido emitido o resultado da imunohistoquímica durante a quimioimunoterapia. No contexto vacina APAVAC[®], a ocorrência desta reação adversa pode ser consequência da migração de células apresentadoras de antígenos para os locais de apresentação antigénica, nomeadamente os linfonodos superficiais (Binder et al., 2000a). No entanto, apenas com base na história clínica do animal, não é possível estabelecer uma relação de casualidade entre a reação adversa e a administração da imunoterapia, sendo necessária informação adicional (histopatologia, citologia e/ou imunohistoquímica) para confirmar a teoria da apresentação antigénica. Tratando-se de um linfoma de células T, deve-se ter em atenção a administração concomitante, com a vacina APAVAC[®], dos fármacos L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida e metotrexato, principalmente na terapêutica de linfoma de células T, por poderem potenciar a ocorrência de meningoencefalite autoimune (Urodelia, 2018). Contudo, no doente 12, não se observaram efeitos secundários adicionais e atribuíveis à administração da quimioimunoterapia, talvez por um lado, pela duração curta do protocolo vacinal (4 semanas) e, por outro, pela morte precoce do animal não permitir a manifestação de efeitos secundários tardios e/ou cumulativos. O caso em questão demonstra, ainda, a importância da realização de imunofenotipagem antes de se iniciar o protocolo vacinal, embora a análise histopatológica revelar o tipo histológico DLBCL.

No doente 11, foi observada uma reação adversa de grau 5 (morte), classificado em reação autoimune, apesar do seu diagnóstico ser meramente presuntivo e com base nos sinais clínicos registrados (dispneia, perda de coordenação motora, perda de equilíbrio, dor na coluna vertebral, polaquiúria, edema da córnea e conjuntiva, convulsões e linfadenopatia ligeira). De fato, a meningoencefalite autoimune pode ocorrer durante a quimioimunoterapia, sobretudo na terapêutica para o linfoma de células T (Urodelia, 2018). De realçar, ainda, que o animal em questão realizou 7 imunizações e, manifestou efeitos secundários face à QC de doses elevadas (toxicidade renal, hepática e hematopoiética), tendo-se mantido com doença estável até ao episódio descrito. Este doente foi diagnosticado com DLBCL, através da análise histopatológica e imunohistoquímica. Assim, tratando-se de um linfoma de células B, não existiam razões plausíveis que impedissem a realização da imunoterapia APAVAC[®]. Contudo, face ao desfecho fatal compatível clinicamente com meningoencefalite autoimune

(grau 5), coloca-se a hipótese de efetivamente não se tratar de um linfoma de células B, mas, pelo contrário, linfoma de células T ou um linfoma de células B rico em células T ("T cell rich B cell lymphoma"). Um resultado como este, demonstra a importância do diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico emitidos, existindo, em última instância, a possibilidade de erros humanos e/ou técnicos. No animal em questão, os estudos histológicos e a imunofenotipagem *pós-mortem* confirmaram o diagnóstico de linfoma de células T. O envolvimento do sistema nervoso e a progressão da doença podem, igualmente, explicar os sinais clínicos observados, contudo, essa hipótese seria menos provável, baseando-se na evolução clínica do doente. Por outro lado, para a confirmação do diagnóstico de meningoencefalite autoimune, poderia ter sido efetuada, igualmente, a recolha de líquido cefalorraquidiano, o exame com ressonância magnética e, a titulação de auto-anticorpos (anticorpos anti-mitocôndria, anti-cadeia dupla de ADN, anti-microsossomais, anti-nucleoproteínas e, anticorpos contra antígenos peri-nucleares e citoplasmáticos) (Janetzki et al., 2000).

No doente 5 foi observada uma reação alérgica ou de hipersensibilidade cutânea, nomeadamente, urticária, estando esta lesão localizada na região cervical, dorso-lombar e membro posterior esquerdo do animal. Tendo em conta os registos da ficha clínica do animal, é importante referir a ausência de informação no que diz respeito ao local de administração da imunoterapia. Neste animal, foi realizada PAAF da lesão, cujo resultado evidenciou uma lesão inflamatória do tipo piogranulomatosa com componente eosinofílica. De fato, a hidroxiapatite, além de desempenhar o papel de vetor/adjuvante vacinal, desencadeia, ainda, quando administrada na derme ou no tecido subcutâneo, uma reação de corpo estranho (Urodelia, 2017), caracterizada pela infiltração de células inflamatórias - macrófagos, eosinófilos e leucócitos polimorfonucleares (Ciocca et al., 2007), tratando-se de alguns dos componentes celulares evidenciados na citologia cutânea do doente 5. Por outro lado, Ciocca e outros colaboradores (2007) reportaram, ainda, a manifestação de reações sistêmicas, como consequência de uma dose vacinal superior (700 µL; 800 µg), sendo, por isso, possível a ocorrência de urticária, em situações onde a quantidade de antígeno vacinal é superior à esperada. Apesar de não estar descrita a ocorrência de urticária secundariamente à imunoterapia APAVAC® (Marconato et al., 2015; Marconato et al., 2014; Simonet et al., 2013; Simonet et al., 2017), não se pode estabelecer, com exatidão, a sua relação de casualidade à administração da imunoterapia, pois não existe um diagnóstico definitivo, nem outros exames complementares mais fidedignos (histopatologia e imunohistoquímica). Tendo a vacina APAVAC® antígenos/alergénios na sua constituição, é plausível a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade, secundariamente à administração da imunoterapia.

Ciocca et al. (2007), ao administrar, no Homem, a vacina baseada nas HSPs, demonstraram a sua segurança e, quando presentes, efeitos secundários moderados (desconforto local,

eritema, pápulas e dor localizada) no local de administração. Por outro lado, em Medicina Veterinária, a administração da imunoterapia APAVAC[®], em cães com linfoma B indolente, DLBCL, linfoma não-Hodgkin e mastocitoma, não demonstrou efeitos secundários relacionados com a sua administração (Marconato et al., 2015; Marconato et al., 2014; Simonet et al., 2013; Simonet et al., 2017). No doente 7, 24h após a administração da vacina APAVAC[®], foi observado edema no local de administração. De fato, em murganhos, a administração subcutânea de hidroxipatite desencadeia uma reação de corpo estranho, despoleta um fluxo de células APC no local de administração e, desencadeia, ainda, uma resposta inflamatória moderada, principalmente 24h após a sua administração (Ciocca et al., 2007), explicando, assim, no doente 7, a ocorrência desta reação adversa. O edema no local de administração (2%; 1/50) foi o único efeito secundário observado, ao qual foi possível atribuir uma relação de causalidade à administração da imunoterapia.

Dois estudos realizados em cães com linfoma multicêntrico, avaliaram os efeitos secundários decorrentes da administração do protocolo CHOP, sendo as toxicidades hematopoiética (neutropénia, anemia e trombocitopénia) [51/75 vs. 143/224] e gastrointestinal (vômito, anorexia, diarreia e enterite) [16/75 vs. 81/224] os efeitos secundários mais frequentes (Burton, Garrett-Mayer, & Thamm, 2013; Hosoya et al., 2007), o que também se verificou neste estudo, pois ocorreram, maioritariamente, as toxicidade hematopoiética (9/50) e gastrointestinal (11/50), nos cães submetidos à quimioimunoterapia com o protocolo CHOP.

Estudos realizados por autores portugueses avaliaram os efeitos secundários decorrentes da administração de fármacos citotóxicos, tendo sido realizada a avaliação conjunta da QM e da QC, esta última com maior representatividade. Silveira (2016) e Cunha (2014) avaliaram, em cães e gatos diagnosticados com várias neoplasias (linfoma, melanoma oral, mastocitoma, carcinoma e sarcoma de tecidos moles), os efeitos secundários decorrentes da administração dos quimioterápicos doxorrubicina (30 mg/m²), vincristina (0,5-0,75 mg/m²), vimblastina (2 mg/m²), ciclofosfamida [QC, 300 mg/m²; QM, 10 mg/m² e associada ao meloxicam (0,1 mg/Kg)], carboplatina (200-300 mg/m²), lomustina (30-50 mg/m²), masitinib (10-15mg/Kg) e mitoxantrona (5-6 mg/m²), sendo a toxicidade gastrointestinal (48,49% vs. 45,24%) e hematopoiética (26,67% vs. 47,62%), os efeitos secundários mais frequentes. Além disso, foram observadas, com menor frequência, a toxicidade renal, dermatológica, cardiotoxicidade, reações anafiláticas, cistite hemorrágica estéril e necrose perivascular. Cunha (2014) demonstrou, ainda, a ocorrência de um maior número de efeitos secundários durante a QC.

Leo et al. (2014) avaliaram os efeitos secundários resultantes da administração de QM [ciclofosfamida (dose média de 14 mg/m²) e AINE (meloxicam, piroxicam ou firocoxib)], em várias neoplasias felinas (sarcoma, carcinoma, melanoma e neoplasia neuroendócrina), sendo as toxicidades gastrointestinal (16%), hematopoiética (8%) e renal (4%), os efeitos

secundários observados. Noutro estudo, em neoplasias felinas e caninas (carcinoma, sarcoma de tecidos moles, melanoma, neoplasias cardíacas e das adrenais), a administração de ciclofosfamida (15 mg/m^2) combinada com o AINE meloxicam ($0,05 \text{ mg/Kg}$) ou piroxicam ($0,3 \text{ mg/Kg}$), demonstrou, apenas, a ocorrência de toxicidade gastrointestinal (2 em 36 dos animais) (Sá, 2016). Elmslie et al. (2008) avaliaram, também, em cães diagnosticados com sarcomas de tecidos moles, os efeitos secundários decorrentes da administração de ciclofosfamida (10 mg/m^2 , PO, SID) combinada com piroxicam ($0,3 \text{ mg/Kg}$), sendo as toxicidades gastrointestinal (7/30), renal (2/30) e ocorrência de cistite hemorrágica estéril (3/30), os efeitos secundários observados.

No estudo realizado, dos animais submetidos a QM, foram observadas as toxicidades gastrointestinal (6/50), hematopoiética (3/50) e renal (1/50), esta última observada numa gata com história prévia de doença renal crónica. Por outro lado, dos animais submetidos à QC, foram observadas as toxicidades gastrointestinal (15/50), hematopoiética (14/50), hepática (6/50), reações imuno-alérgicas (3/50), alterações no local de administração (1/50) e toxicidade renal (1/50). Verificou-se, assim, que os efeitos secundários mais frequentes na amostra em estudo vão ao encontro dos reportados na bibliografia anteriormente mencionada, pois ocorreu, maioritariamente, a toxicidade gastrointestinal (22/50) e hematopoiética (17/50), nos animais submetidos a quimioimunoterapia. Por outro lado, tendo em consideração a quimiosensibilidade das células que constituem tanto o trato gastrointestinal, como a medula óssea, devido à sua constante atividade mitótica não é de estranhar a sensibilidade destes tecidos aos fármacos citotóxicos administrados, bem como a ocorrência das toxicidades gastrointestinal e hematopoiética (Gustafson & Page, 2013). Logo, estas modalidades terapêuticas (quimioterapia vs. quimioimunoterapia) sendo idênticas no que diz respeito aos efeitos secundários observados, permitem reforçar a segurança em relação à imunoterapia APAVAC[®], uma vez que não se verifica incremento significativo de toxicidade de uma terapia para a outra.

Além disso, no estudo realizado, a ocorrência de efeitos secundários foi, igualmente, superior nos animais submetidos a QC. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Kerbel & Kamen (2004), que referem uma toxicidade inferior na QM, comparativamente à QC.

Em relação aos efeitos secundários observados durante a quimioterapia, as diferenças encontradas entre o estudo realizado e os vários estudos apresentados (Leo et al., 2014; Elmslie et al., 2008; Sá, 2016; Cunha, 2014; Silveira, 2016; Hosoya et al., 2007; Burton et al., 2013) podem ser explicadas por vários fatores, nomeadamente, (1) dose e protocolos utilizados, (2) diversidade e localização das neoplasias, (3) duração da quimioterapia (QC e QM), (4) *score* clínico (ex., estágio clínico e doenças concomitantes) e, por último, (4) frequência e tipo de controlo analítico.

No presente estudo, tendo em consideração a gravidade dos efeitos secundários e as suas frequências relativas, a administração da vacina APAVAC® demonstrou-se segura e não parece prejudicar a qualidade de vida dos doentes ou incrementar significativamente a toxicidade das referidas terapêuticas quimioterápicas associadas (QM e QC), sendo a maioria dos efeitos adversos registados (92%) consistentes com os expectáveis durante a QM e QC de doses elevadas. Os restantes 8% dizem respeito a edema no local de administração (2%), urticária, linfadenomegália e reação autoimune (6%). Como não existem certezas no que diz respeito à relação de causalidade entre a administração da APAVAC® e os efeitos secundários urticária, linfadenomegália e suspeita de reação autoimune, este estudo pode, apenas, concluir que 2% dos efeitos secundários observados (edema no local de administração) estão relacionados, exclusivamente, com a administração da imunoterapia APAVAC®.

Pela natureza retrospectiva do estudo, a identificação da maioria dos efeitos secundários foi efetuada a partir da análise das fichas clínicas do animal, estando, por isso, dependente dos registos efetuados pelo médico veterinário, bem como do tipo de informação transmitida pelos tutores. Deste modo, os resultados obtidos poderão não ser totalmente objetivos, serem sujeitos a diferentes interpretações ou estarem incompletos.

4.4 Avaliação da resposta clínica

No melanoma oral, nas metástases cutâneas de carcinoma mamário, bem como no sarcoma de tecidos moles, a quimioimunoterapia produziu uma resposta clínica negativa, pela ausência de resposta à terapêutica (n=3) ou evidência de metastização (n=1) durante o protocolo terapêutico. É de salientar, que apenas um dos três doentes apresentava doença residual mínima, por ter sido submetido a citoredução cirúrgica antes de se iniciar a quimioimunoterapia; e que dois dos animais apresentavam doença metastática, um deles à distância e, outro no linfonodo regional. Estes resultados vêm reforçar o fato da eficácia das vacinas baseadas nas HSPs ser limitada em doentes com doença avançada e com múltiplas metástases, demonstrando eficácia apenas numa parte dos doentes (Tamura et al., 1997; Zhang & Zheng, 2013).

Embora o doente com hemangiopericitoma permanecer em remissão completa da doença durante a quimioimunoterapia, a lesão reapareceu 4 meses após a conclusão do protocolo vacinal. Por outro lado, este animal apresentava, no início da quimioimunoterapia, doença residual mínima, por ter sido submetido previamente a citoredução cirúrgica.

No linfoma canino, apesar da QC de doses elevadas melhorar a duração da remissão clínica e prolongar o tempo de sobrevivência dos doentes, a doença é incurável e, em situações de recidiva, revela-se refratária aos tratamentos quimioterápicos subsequentes (Marconato et al., 2014). Tendo em conta o número de animais submetidos à quimioimunoterapia, a taxa de recidiva foi alta, aproximadamente 62,5% (5/8). Os doentes que saíram de remissão precocemente (após a 1ª e a 2ª imunização) foram submetidos a um maior número de

protocolos de resgate e, a um menor número de imunizações (6 e 4 imunizações, respectivamente). Dos animais que saíram de remissão durante a quimioimunoterapia (n=5), 40% (2/5) saiu no início do protocolo (após a 1ª e a 2ª imunização) e 60% (3/5) no final do protocolo vacinal (após a 6ª e a 7ª imunização).

As vacinas anti-tumorais assumem um interesse especial nas situações onde a cirurgia ou a radioterapia são ineficientes, pela localização ou metastização tumorais. Por outro lado, essas vacinas são utilizadas, preferencialmente, nas neoplasias tratadas cirurgicamente ou com radioterapia e, num estágio inicial da doença. Nessa ocasião, o seu principal objetivo consiste na eliminação da doença residual mínima e na prevenção da sua recorrência (Kelly et al., 2018). Embora nos doentes com linfoma não tenha sido possível a citoredução cirúrgica, pela natureza hematopoiética da neoplasia, a citoredução induzida pelo protocolo CHOP (remissão completa da doença) conduziu, igualmente, a um estado de doença residual mínima. Posto isto, a imunização ativa dos animais foi efetuada, na maioria dos doentes (7/8), quando estes se encontravam em remissão completa da doença, visando a eliminação das células neoplásicas residuais, a produção de uma resposta imunitária anti-tumoral eficaz e duradoura e, em última instância, a cura da doença. Dos cães com linfoma submetidos à quimioimunoterapia, 87,5% (7/8) alcançaram a remissão completa, 62,5% (5/8) saíram de remissão e, 12,5% (1/8) mantiveram doença estável durante o protocolo vacinal. Por outro lado, no momento da análise de dados, 37,5% (3/8) estavam vivos, 37,5% (3/8) foram eutanasiados devido a doença progressiva e 25% (2/8) foram eutanasiados devido a causas não relacionadas com o linfoma.

As vacinas baseadas nas HSPs, demonstraram bons resultados em (1) doentes com doença recorrente, (2) em tumores primários em crescimento e sem evidência de metastização e, (3) em tumores reduzidos cirurgicamente (Ciocca et al., 2007). Por essas razões a imunoterapia APAVAC® foi a opção terapêutica escolhida para os animais pertencentes à espécie felina, pois existiam animais submetidos, previamente, a cirurgia citoredutora (6/8; tumores mamários), bem como animais com doença recorrente e sem sinais evidentes de metastização (2/8; sarcóide felino e fibrossarcoma).

Os animais com fibrossarcoma e sarcóide felino apresentaram uma resposta negativa à terapêutica, como resultado do aumento progressivo das lesões durante a quimioimunoterapia. De fato, os estudos efetuados com as vacinas baseadas nas HSPs, demonstraram melhores resultados em neoplasias reduzidas cirurgicamente e em estádios de doença residual mínima (Ciocca et al., 2012), pressupostos não assegurados em ambos os doentes.

Após a citoredução cirúrgica, o principal objetivo das vacinas anti-tumorais consiste também na eliminação da doença residual mínima/micrometástases e na prevenção da sua recorrência (Ciocca et al., 2012; Kelly et al., 2018). De fato, após a citoredução tumoral, a carga tumoral, as células imunossupressoras (ex., células Treg) e, os mediadores

inflamatórios (ex., TGF- β , IL-10) estão diminuídos (Ciocca et al., 2012). A totalidade (6/6) das gatas com neoplasia mamária foi submetida a cirurgia citorrredutora previamente à quimioimunoterapia. Neste estudo, a quimioimunoterapia visa reforçar a eliminação das células neoplásicas e/ou micrometástases, por um lado através dos efeitos citotóxicos, imunomoduladores e anti-angiogênicos induzidos pela QM, por outro lado através da resposta anti-tumoral produzida pela vacina APAVAC[®]. A administração de ciclofosfamida combinada com um AINE, potencia, ainda, a resposta anti-tumoral e à imunoterapia, por favorecer a depleção de células Treg e dos fatores imunossupressores libertados pelas células MDSC (Madondo et al., 2016; Talmadge et al., 2007).

Nas gatas com adenocarcinoma mamário, 50% (3/6) delas estavam vivas no momento da análise de dados, 50% (3/6) foram eutanasiadas devido a doença progressiva (doentes 15, 19 e 20) e, 50% (3/6) mantiveram-se em remissão completa da doença, sem recidiva local do tumor primário nem evidência de metastização. Ainda neste grupo, metade (3/6) das gatas apresentaram uma resposta negativa à quimioimunoterapia, tendo-se observado metastização pulmonar em 33% (2/6) da amostra em estudo e, metastização no sistema nervoso central em 16,7% (1/6) das gatas com neoplasia mamária. É importante referir que as gatas que responderam negativamente à quimioimunoterapia encontravam-se, ao diagnóstico, num estágio avançado da doença (estádios III e IV). Estes resultados vêm reforçar o fato da eficácia das vacinas baseadas nas HSPs ser limitada em animais com doença avançada, apresentando, por isso, maior eficácia vacinal num estágio inicial da doença (Tamura et al., 1997; Zhang & Zheng, 2013).

O sucesso da imunoterapia é influenciado pela via de administração, esquema vacinal e natureza dos antígenos tumorais. A utilização de antígenos tumorais autólogos confere menor imunogenicidade vacinal, possibilitando a produção de uma resposta imunitária fraca ou fenómenos de tolerância antígenoica (Dyall et al., 1998; Kelly et al., 2018), daí a utilização de adjuvantes vacinais e estimulantes da resposta imunitária inata (HSPs e hidroxapatite), ambos presentes na vacina APAVAC[®]. Por isso, de modo a promover uma resposta anti-tumoral eficiente é necessário aumentar a imunogenicidade antígenoica, otimizar o transporte e a apresentação dos antígenos tumorais e, modelar o sistema imunitário do animal, com o objetivo de contrariar a imunossupressão induzida pelos fármacos citotóxicos e pelo próprio microambiente tumoral (Marconato et al., 2014; Hollander, 2012; Walter et al., 2006; Guth & Dow, 2013).

Na vacina APAVAC[®], os complexos gp96/péptido internalizados pelas APC, através da interação com o recetor CD91, são apresentados segundo o contexto MHC-I e MHC-II, às células T CD8+ e CD4+, respetivamente (Urodelia, 2018). Para que as células T sejam eficientes contra as células neoplásicas, é necessária a expressão de moléculas co-estimuladoras (ex., B7-1, B7-2 e CD28), em ambas as células (T e APC) (Frayssinet et al., 2008). Além disso, é importante ter em conta que os animais submetidos à imunoterapia

podem estar imunodeprimidos, devido à administração de fármacos quimioterápicos (Hollander, 2012; Walter et al., 2006). No presente estudo, na maioria dos animais (19/20) foi efetuada a associação da imunoterapia APAVAC® com a QC ou QM, logo, nestes animais a imunossupressão ou a alteração da expressão das moléculas co-estimuladoras podem influenciar a resposta anti-tumoral e celular produzidas.

A maioria dos animais (55%; 11/20) não concluiu o protocolo vacinal devido a vários fatores como (1) a ocorrência de efeitos secundários à quimioterapia debilitantes, impossibilitando, desse modo, a sua imunização, (2) a eutanásia dos animais antes da conclusão do protocolo vacinal, (3) a ausência de resposta positiva à terapêutica e, por último, (4) a alteração do protocolo terapêutico instituído. O fato de 55% dos animais não terem concluído o protocolo/tempo vacinal pode ter influenciado a resposta clínica observada neste estudo retrospectivo. Por outro lado, por se tratar de uma imunoterapia relativamente recente, não está identificado qual o melhor protocolo vacinal (tempo e dose vacinal), fator que pode, igualmente, influenciar a resposta clínica observada.

No estudo realizado, a resposta clínica observada foi influenciada pela carga tumoral e duração da quimioimunoterapia. Numa vacina anti-tumoral, o tempo de resposta compreende semanas a meses [tabela 5], devido à indução lenta das células T efectoras e T de memória (Bergman, 2017; Regan et al., 2016). Logo, a não conclusão do protocolo vacinal, observada em 55% dos animais em estudo, e a morte precoce dos animais, podem impedir a observação de uma resposta clínica positiva, já que a resposta imunitária anti-tumoral pode demorar semanas a meses a ser produzida. Por outras palavras, o tempo decorrido entre o início da imunoterapia APAVAC® e a eutanásia do animal pode não ter sido suficiente para evidenciar a resposta anti-tumoral produzida. Por outro lado, a presença de uma carga tumoral elevada é capaz de superar a resposta anti-tumoral produzida (Caudill & Li, 2001), logo, nos animais aos quais não foi realizada a citoredução cirúrgica, a carga tumoral, durante a quimioimunoterapia, foi mais elevada, dificultando, por isso, o sucesso da resposta anti-tumoral produzida.

4.5 Limitações do estudo

A maior limitação deste estudo retrospectivo consiste na heterogeneidade da amostra no que se refere às neoplasias em análise, constituída por diferentes tipos e subtipos das mesmas. Além disso, foram incluídas no estudo neoplasias de duas espécies distintas (cão e gato). Para cada espécie, o número de doentes que a representava era reduzido (12 vs. 8), traduzindo uma menor frequência absoluta para cada uma das neoplasias estudadas. A amostra reduzida reflete o fato da imunoterapia com proteínas de choque térmico ser uma terapêutica recente, não existindo, por isso, muitos estudos a comprovarem a sua eficácia, influenciando, desse modo, a decisão dos tutores. Além do mais, trata-se de uma terapia cara, não estando por isso ao alcance financeiro de todos os tutores.

Tratando-se de um estudo retrospectivo, as conclusões retiradas baseiam-se nas observações clínicas registadas durante a terapêutica, não tendo sido estabelecido, igualmente, um plano de estudo prévio. Devido à inexistência de um plano de estudo prévio, não se estabeleceram variáveis controláveis, pelo que se incluiu no estudo qualquer animal sujeito a imunoterapia com APAVAC®, independentemente do tipo de neoplasia, espécie ou terapêutica.

Por outro lado, os protocolos terapêuticos instituídos não se revelaram uniformes, tendo sido estabelecidos protocolos e modalidades terapêuticas diversas (QM, QC, imunoterapia), bem como fármacos citotóxicos diversos, consoante a neoplasia a tratar.

A heterogeneidade observada nos protocolos terapêuticos e na amostra de neoplasias, dificulta a realização de comparações com outros estudos e entre animais, além de influenciar os resultados obtidos.

Pela sua natureza retrospectiva, a duração das terapêuticas foi variável e, a frequência de realização de análises sanguíneas de controlo, para aferir as toxicidades renal, hepática e hematopoiética, variou, igualmente, consoante o protocolo terapêutico instituído e a adesão dos tutores.

Os diagnósticos presuntivos ou duvidosos, bem como as causas de morte, poderiam ter sido confirmados consoante a análise *pós-mortem* e a colheita de material para análise histopatológica.

Em relação à resposta clínica durante a quimioimunoterapia, a sua avaliação foi subjetiva, recorrendo-se aos registos das fichas clínicas dos animais, à presença ou ausência de sinais clínicos e aos resultados dos exames complementares. Por outro lado, em alguns animais, a ausência de exames complementares para a avaliação da progressão da doença (dimensões do tumor e desenvolvimento de metástases), revelou-se, também, uma limitação no estudo realizado. Em particular, o estabelecimento de remissão no linfoma canino, baseou-se na palpação e medição dos linfonodos superficiais, por diferentes médicos veterinários, existindo, por isso, margem para alguma subjetividade e variação nos resultados. O estado de remissão poderia ter sido, igualmente, avaliado com o recurso a citologia (PAAF) dos linfonodos superficiais ou realização de citometria de fluxo do aspirado ganglionar, de modo a avaliar, com exatidão, a resposta clínica dos doentes face à quimioimunoterapia.

Até ao momento, o método *gold standard* para avaliar a resposta clínica a uma determinada terapêutica baseia-se nos critérios RECIST, versão 1.0 (Nguyen et al., 2015; Vail et al., 2010). Por outro lado, a maioria dos estudos científicos baseiam-se no tempo de sobrevivência, para com isso avaliar a eficácia clínica de uma determinada terapêutica anti-neoplásica, incluindo a imunoterapia anti-tumoral.

No contexto da avaliação da eficácia clínica à quimioimunoterapia, para que essa análise seja estatisticamente válida, é necessária a realização de um estudo prospetivo (grupo teste

vs. grupo controlo), baseado na comparação dos tempos de sobrevivência (ex., “endpoints” TTP e LSS) e realizado numa amostra homogénea, no que diz respeito à espécie, neoplasia e estágio clínico da doença. Estes pressupostos não estiveram assegurados na realização do estudo vigente, logo a realização de uma análise baseada no tempo de sobrevivência para aferir a eficácia vacinal não foi, igualmente, possível.

Embora a eficácia clínica da quimioimunoterapia poder ser avaliada com base nos tempos de sobrevivência, utilizando, para esse efeito, um grupo controlo e um grupo teste, é possível, igualmente, a sua avaliação numa amostra única de doentes, não existindo assim a necessidade de um grupo de controlo. Contudo, para a obtenção de resultados fidedignos, é necessária a avaliação conjunta da resposta clínica e exames imagiológicos mais sofisticados (tomografia computadorizada e ressonância magnética), bem como estudos histológicos e imunohistoquímicos comparativos, nos períodos pré- e pós-vacinais. Além disso, com o objetivo de avaliar a sua eficácia clínica, para além desses métodos, poder-se-ia realizar, igualmente, a monitorização da resposta anti-tumoral produzida. Nessa avaliação recorre-se a métodos imunológicos, que visam a avaliação do número e função das células T CD4+ e T CD8+ (Clay, Hobeika, Mosca, Lyster, & Morse, 2001). Com base nos pressupostos anteriormente apresentados, no estudo realizado, o modo como foi avaliada a resposta clínica durante a quimioimunoterapia, não permitiu uma avaliação mais detalhada da resposta à terapêutica nem a eficácia da quimioimunoterapia.

As técnicas de monitorização da resposta anti-tumoral baseiam-se na hipersensibilidade tardia (TCHT), na proliferação de células T CD4+, na função das células T citotóxicas (CD8+), no perfil de secreção de citocinas (ex., IL-2, IL-12 e IFN- γ), no título de anticorpos e, no fenótipo linfocitário (citometria de fluxo) (Lamano et al., 2016). Certamente, os métodos realizados *in vivo* (ex., teste cutâneo de hipersensibilidade tardia - TCHT), pela sua simplicidade e viabilidade, são os mais utilizados, embora a sua especificidade seja reduzida (Clay et al., 2001). No TCHT, após a injeção do lisado tumoral, poder-se-ão, ainda, realizar biópsias cutâneas para a pesquisa de células T antigénio-específicas (De Vries et al., 2005). Em Medicina Veterinária, estudos em linfoma em cães, utilizaram o TCHT como método de monitorização da resposta anti-tumoral, tendo demonstrando respostas positivas (endurecimento ou eritema) nos animais vacinados com a imunoterapia APAVAC® (Marconato et al., 2015; Marconato et al., 2014), reforçando, assim, a sua eficácia clínica nos animais vacinados, quando estes resultados são avaliados conjuntamente com a resposta clínica dos animais.

A coluna de cromatografia com nanopartículas de hidroxiapatite permite a purificação das proteínas desejáveis, obtendo-se, assim, a vacina APAVAC® constituída por dois componentes: o antigénio (complexo gp96/antigénio tumoral) e o adjuvante/vetor (hidroxiapatite) (Urodelia, 2017). Embora a cromatografia por afinidade permitir o isolamento do complexo péptido/gp96, é plausível a ocorrência de erros técnicos durante a purificação

da vacina anti-tumoral, resultando, assim, doses vacinais com quantidades de HSPs inadequadas (elevadas ou reduzidas) ou a presença de HSPs contaminantes, desencadeando, por isso, respostas anti-tumorais e clínicas não desejáveis. No estudo realizado, não foi avaliada a natureza nem a quantidade de HSPs presente nas vacinas administradas. Contudo, esses parâmetros poderiam ter sido aferidos com recurso a técnicas de eletroforese, nomeadamente SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida), *Western blotting* ou *slot blot* (Ciocca et al., 2007), de modo a assegurar o grau de pureza (natureza e quantidade de HSPs) das vacinas administradas, assim como a produção da resposta anti-tumoral pretendida, embora existam diversos fatores capazes de influenciar o sucesso dessa resposta. Os estudos desenvolvidos no âmbito das vacinas baseadas nas HSPs chegaram à conclusão que quanto maior for a dose e os tempos vacinais, maior é a eficácia clínica dessas vacinas anti-tumorais (Zhang & Zheng, 2013). Contudo, deve ser prestada atenção especial no que diz respeito à quantidade de HSPs presente na vacina, pois estudos, em murganhos, ao utilizarem quantidades de gp96 superiores à considerada ótima para a espécie, demonstraram a inibição da resposta imunitária anti-tumoral, como consequência da elevação de células Treg imunossupressoras (Chandawarkar, Wagh, & Srivastava, 1999). Por outro lado, embora exista tecido tumoral suficiente, a quantidade de HSPs purificadas pode revelar-se insuficiente na produção da vacina anti-tumoral (Randazzo et al., 2012), tendo, por isso, repercussões não só na resposta anti-tumoral produzida, como também na resposta/eficácia clínica.

Concluindo, no estudo presente não foi possível a avaliação mais detalhada da resposta à terapêutica com quimioimunoterapia nem a avaliação da sua eficácia clínica, por se tratar de um estudo não controlado, retrospectivo e com várias limitações, nomeadamente, a heterogeneidade da amostra, a carência de registos clínicos e exames complementares (imagiológicos, histológicos e imunohistoquímicos comparativos, nos períodos pré- e pós-vacinais), bem como a implementação de diferentes protocolos terapêuticos em neoplasias distintas.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente estudo teve como objetivos principais a avaliação, em cães e gatos com neoplasias sólidas, dos efeitos secundários e da resposta clínica, durante a quimioimunoterapia com a vacina APAVAC[®], uma vacina anti-tumoral baseada na proteína de choque térmico gp96.

Relativamente aos seus efeitos secundários, a quimioimunoterapia com a vacina APAVAC[®] demonstrou-se segura, sendo a maioria dos efeitos adversos registados (92%) consistentes com os expectáveis durante a quimioterapia metronómica (QM) e quimioterapia convencional (QC) de doses elevadas. Os restantes 8% dizem respeito aos efeitos secundários edema no local de administração (2%), urticária, linfadenomegália e suspeita de reação autoimune (6%).

No que diz respeito à avaliação da resposta clínica, pela natureza retrospectiva do estudo, não se tornou possível a sua avaliação mais detalhada, sendo necessário para tal a realização de outros exames complementares mais sofisticados nos períodos pré- e pós-vacinais.

Em conclusão e apesar das limitações associadas ao estudo retrospectivo, este estudo demonstrou viabilidade e segurança durante a administração da vacina APAVAC[®], combinada com a quimioterapia (QC ou QM). Contudo, são necessários mais estudos no âmbito da imunoterapia com APAVAC[®], de modo a comprovar a sua eficácia clínica em várias neoplasias, assim como os métodos objetivos capazes de selecionar os doentes elegíveis à realização da terapêutica e, aqueles que permitem a monitorização fidedigna da resposta imunitária anti-tumoral.

São exploradas, atualmente, estratégias adjuvantes que visam melhorar a resposta imunitária anti-tumoral, através da inibição do microambiente tumoral imunossupressor (ex., inibidores das células Treg) e/ou das moléculas co-inibidoras (ex., inibidores dos pontos de controlo CTLA-4, PD-1), bem como a utilização de moléculas inibidoras das HSP90 (Neckers & Workman, 2012; Klebanoff et al., 2011; Regan et al., 2016).

Apesar dos esforços na investigação das vacinas baseadas nas HSPs, permanecem, ainda, perguntas a merecer de resposta, nomeadamente, se a resposta imunitária produzida é dose-dependente, se a imunoterapia deve ser iniciada, apenas, com os animais em remissão completa ou após a citoredução cirúrgica, se a resposta produzida é duradoura e, por último, se os animais beneficiam de reforços vacinais e qual o protocolo vacinal mais adequado, para cada tipo de neoplasia (Marconato et al., 2015).

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2016). Immune responses against tumors and transplants. In *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (5th ed., pp. 189–204). Missouri: Elsevier.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews*, 222(1), 155-161.
- André, N., Carré, M., & Pasquier, E. (2014). Metronomics: Towards personalized chemotherapy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(7), 413-431.
- Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., de la Salle, H., & Schild, H. (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(7), 3757–3760.
- Bahram, S., Inoko, H., Shiina, T., & Radosavljevic, M. (2005). MIC and other NKG2D ligands: From none to too many. *Current Opinion in Immunology*, 17(5), 505-509.
- Ballas, Z., & Rasmussen, W. (1990). NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8-thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol*, 145(4), 1039–1045.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., & Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14(3), 303–313.
- Benlagha, K., & Bendelac, a. (2000). CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Seminars in Immunology*, 12(6), 537–542.
- Benson, D. M., Bakan, C. E., Mishra, A., Hofmeister, C. C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R. A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M. K., Greenfield, C. N., Porcu, P., Devine, S. M., Roten-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J. C. & Caligiuri, M. A. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: A therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*, 116(13), 2286-2294.
- Bergman, P. (2017). Veterinary Oncology Immunotherapies. *Vet Clin Small Animal*, 48(2), 257–277.
- Biller, B. (2017). Cancer immunotherapy. In Elsevier (Ed.), *Textbook of veterinary internal medicine* (8th ed.). Missouri.
- Binder, R. J., Anderson, K. M., Basu, S., & Srivastava, P. K. (2000a). Cutting Edge: Heat Shock Protein gp96 Induces Maturation and Migration of CD11c+ Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 165(11), 6029–6035.
- Binder, R. J., Han, D. K., & Srivastava, P. K. (2000b). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nature Immunology*, 1(2), 151–155.
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Kessler, M., Pastor, J., Ponce, F., Savary-Bataille, K. & Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). *IY31CH16-Cresswell Pathways of Antigen Processing. Annu. Rev. Immunol* (Vol. 31), 443-73.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2).
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., & Van Pel, a. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 12, 337–365.
- Bosco, M. C., Puppo, M., Blengio, F., Fraone, T., Cappello, P., Giovarelli, M., & Varesio, L. (2008). Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*, 213(9-10), 733-749.
- Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D. M., & Zanoello, P. (2003). L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in Immunology*, 24(6), 301-305.
- Bubeník, J. (2003). Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review).

- Oncology Reports*, 10(6), 2005-2008.
- Burton, J. H., Garrett-Mayer, E., & Thamm, D. H. (2013). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 306-315.
- Calderwood, S. K., Stevenson, M. A., & Murshid, A. (2012). Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune Diseases*, 1(1), 2012, 1-10.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., & Bendelac, A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 163(9), 4647-4650.
- Carter, L. L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J. & Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32(3), 634-643.
- Caudill, M. M., & Li, Z. (2001). HSPPC-96: a personalised cancer vaccine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 1(3), 539-547.
- Chandawarkar, R., Wagh, M., & Srivastava, P. (1999). The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(9), 1437-42.
- Chatterjee, S., & Burns, T. F. (2017). Targeting heat shock proteins in cancer: A promising therapeutic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10.
- Chen, Z., & Freedman, M. S. (2008). Correlation of specialized CD16+ $\gamma\delta$ T cells with disease course and severity in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 194(1-2), 147-152.
- Chow, A. Y. (2010). Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education*, 3(9), 7.
- Chuang, T. F., Lee, S. C., Liao, K. W., Hsiao, Y. W., Lo, C. H., Chiang, B. L., Lin, X., Z., Tao, M. H. & Chu, R. M. (2009). Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. *International Journal of Cancer*, 125(3), 698-707.
- Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10(2), 86.
- Ciocca, D. R., Cayado-Gutierrez, N., Maccioni, M., & Cuello-Carrion, F. D. (2012). Heat Shock Proteins (HSPs) Based Anti-Cancer Vaccines. *Current Molecular Medicine*, 12(9), 1183-1197.
- Ciocca, D. R., Frayssinet, P., & Cuello-Carrión, F. D. (2007). A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients. *Cell Stress & Chaperones*, 12(1), 33-43.
- Clay, T. M., Hobeika, A. C., Mosca, P. J., Lyster, H. K., & Morse, M. A. (2001). Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 1127-1135.
- Corrales, L., Ajona, D., Rafail, S., Lasarte, J. J., Riezu-Boj, J. I., Lambris, J. D., Rouzauat, A., Pajares, M. J., Montuenga, L. M. & Pio, R. (2012). Anaphylatoxin C5a Creates a Favorable Microenvironment for Lung Cancer Progression. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4674-4683.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Cunha, E. S. G. (2014). *Avaliação dos efeitos secundários dos fármacos quimioterápicos em animais de companhia: estudo retrospectivo*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Dallegri, F., Ottonello, L., Ballestrero, A., Dapino, P., Ferrando, F., Patrone, F., & Sacchetti, C. (1991). Tumor cell lysis by activated human neutrophils: Analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, 15(1), 15-30.
- De Vries, I. J. M., Bernsen, M. R., Lesterhuis, W. J., Scharenborg, N. M., Strijk, S. P.,

- Gerritsen, M. J. P., Ruiter, D. J., Figdor, C. G., Punt, C. J. A. & Adema, G. J. (2005). Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 23(24), 5779–5787.
- Dighe, a S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), 447–456.
- Dobson, J., & Lascelles, B. (2011). *BSAVA Manual of canine and feline oncology* (3rd ed.). England: British Small Animal Veterinary Association.
- Dubey, A., Prajapati, K. S., Swamy, M., & Pachauri, V. (2015). Heat shock proteins: A therapeutic target worth to consider. *Veterinary World*, 8(1), 46–51.
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329–360.
- Dyall, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaout, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N. & Nikolić-Žugić, J. (1998). Heteroclitic Immunization Induces Tumor Immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(9), 1553–1561.
- Elmslie, R. E., Glawe, P., & Dow, S. W. (2008). Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1373–1379.
- Frayssinet, P., Ciocca, D., & Rouquet, N. (2008). Calcium phosphate powder for cancer vaccination. *Bioceramics*, Vol 20, Pts 1 and 2, 361–363, 1207–1210.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. & Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(10), 1096–1103.
- Galdiero, M. R., Marone, G., & Mantovani, A. (2017). Cancer inflammation and cytokines. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 10(3), 1–18.
- Garrido, F., Algarra, I., & García-Lora, A. M. (2010). The escape of cancer from T lymphocytes: Immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(10), 1601–1606.
- Gaspar, T. B., Henriques, J., Marconato, L., & Queiroga, F. L. (2018). The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs—insight into a modern cancer field. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(1), 2–11.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., & Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(3), 327–333.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E. & Hayday, C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5542), 605–609.
- Gogoi, D., & Chiplunkar, S. V. (2013). Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research*, 138(5), 755–761.
- Gregory, A. D., & Houghton, A. M. (2011). Tumor-associated neutrophils: New targets for cancer therapy. *Cancer Research*, 71(7), 2411–2416.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., & Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6879–6884.
- Guidi, L., Baroni, R., Bartoloni, C., Pellegrino, M., Tricerri, A., Marciano, M., Barone, C. & Gambassi, G. (1988). Immune complexes in solid tumours precipitable by 3.5% polyethylene glycol: analysis of some nonspecific components. *Diagnostic and Clinical Immunology*, 5(6), 284–288.

- Güngör, N., Knaapen, A. M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G. R., Chiu, R. K., Godschalk, R. & Van Schooten, F. J. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 25(2), 149–154.
- Gustafson, D., & Page, R. (2013). Cancer chemotherapy. In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed., pp. 157–179). Missouri: Elsevier Saunders.
- Guth, A. M., & Dow, S. (2012). Cancer Immunotherapy. In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Fifth Edition* (pp. 120–128).
- Hanahan, D., Bergers, G., & Bergsland, E. (2000). Less is, more, regularly: Metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1045–1047.
- Hanahan, & Weinberg. (2011). Cell - Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, Volume 144, Issue 5, 646–674, 4 March 2011.
- Hawiger, D., Wan, Y. Y., Eynon, E. E., & Flavell, R. A. (2010). The transcription cofactor Hopx is required for regulatory T cell function in dendritic cell-mediated peripheral T cell unresponsiveness. *Nature Immunology*, 11(10), 962–968.
- Hendrick, J. P., & Hartl, F. U. (1993). Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 349–384.
- Herber, D. L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V., Nagaraj, S., Tyurin, V. A., Corzo, A., Cho, H., Celis, E., Lennox, B., Knight, S., Padhya, T., McCaffrey, T., McCaffrey J., Antonia, S., Fishman, M., Ferris, R., Kagan, V. & Gabrilovich, D. I. (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature Medicine*, 16(8), 880–886.
- Heughebaert, M., LeGeros, R. Z., Gineste, M., Guilhem, A., & Bonel, G. (1988). Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 22(14 S), 257–268.
- Hodge, J. W., Ardiani, A., Farsaci, B., Kwilas, A. R., & Gameiro, S. R. (2012). The tipping point for combination therapy: Cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors. *Seminars in Oncology*, 39(3), 323–39.
- Hogge, G. S., Burkholder, J. K., Culp, J., Albertini, M. R., Dubielzig, R. R., Yang, N. S., & MacEwen, E. G. (1999). Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther*, 6(1), 26–36.
- Hollander, N. (2012). Immunotherapy for B-cell lymphoma: Current status and prospective advances. *Frontiers in Immunology*, 3(JAN).
- Hosoya, K., Kisseberth, W. C., Lord, L. K., Alvarez, F. J., Lara-Garcia, A., Kosarek, C. E., London, C. & Couto, C. G. (2007). Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(6), 1355–63.
- Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5161), 961–965.
- Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., & Chen, S. H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research*, 66(2), 1123–1131.
- Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J. J., & Srivastava, P. K. (2000). Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: A pilot study. *International Journal of Cancer*, 88(2), 232–238.
- Janeway, C. A., Schlomchik, M., Walport, M., & Travers, P. (2011). B-cell activation by armed helper T cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Al, E. (2001). Principles of innate and adaptive immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 7, 1–9.
- Jas, D., Soyer, C., De Fornel-Thibaud, P., Oberli, F., Vernes, D., Guigal, P. M., Poulet, H. & Devauchelle, P. (2014). Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials in Vaccinology*, 4, 1–8.
- Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L. F., Liu, A., Daniel, B. J., Shin, T., Curiel, T. & Zhang,

- B. (2010). CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: A novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Research*, 70(6), 2245–2255.
- Kaja, S., Kiran, S. V. N. S., Kattapagari, K., Chitturi, R., Chowdary, Sd., & Reddy, B. R. (2017). A review on tumor immunology. *Journal of Orofacial Sciences*, 9(1), 7.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Immunology*, 95(June), 7556–7561.
- Kelly, M., McNeel, D., Fisch, P., & Malkovsky, M. (2018). Immunological considerations underlying heat shock protein-mediated cancer vaccine strategies. *Immunology Letters*, 193, 1-10.
- Kerbel, R. S., & Kamen, B. A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 423-36.
- Klebanoff, C. A., Acquavella, N., Yu, Z., & Restifo, N. P. (2011). Therapeutic cancer vaccines: Are we there yet? *Immunological Reviews*, 239(1), 27–44.
- Knapp, D. W., Glickman, N. W., Denicola, D. B., Bonney, P. L., Lin, T. L., & Glickman, L. T. (2000). Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urologic Oncology*, 5(2), 47-59.
- Kobiyama, K., Jounai, N., Aoshi, T., Tozuka, M., Takeshita, F., Coban, C., & Ishii, K. (2013). Innate Immune Signaling by Genetic Adjuvants for DNA Vaccination. *Vaccines*, 1(3), 278–292.
- Kumaraguru, U., Suvas, S., Biswas, P. S., Azkur, A. K., & Rouse, B. T. (2004). Concomitant Helper Response Rescues Otherwise Low Avidity CD8+ Memory CTLs to Become Efficient Effectors In Vivo. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3719–3724.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology*, 172(2), 989–999.
- Lamano, J. B., Ampie, L., Choy, W., Kesavabhotla, K., DiDomenico, J. D., Oyon, D. E., Parsa, A., & Bloch, O. (2016). Immunomonitoring in glioma immunotherapy: current status and future perspectives. *Journal of Neuro-Oncology*, 127(1), 1-13.
- Lammert, E., Arnold, D., Nijenhuis, M., Momburg, F., Hämmerling, G. J., Brunner, J., Stevanovic, S., Rammensee, H. & Schild, H. (1997). The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *European Journal of Immunology*, 27(4), 923–927.
- Janier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L., & Babcock, G. F. (1983). Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 131(4), 1789–1796.
- Larocca, C., & Schlom, J. (2011). Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. *Cancer Journal*, 17(5), 359-371.
- Lehner, T., Bergmeier, L. A., Wang, Y., Tao, L., Sing, M., Spallek, R., & Van Der Zee, R. (2000). Heat shock proteins generate β -chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 30(2), 594–603.
- Leo, C., Stell, A., Borrego, J., Martinez de Merlo, E., Ruess-Melzer, K., & Lara-Garcia, A. (2014). Evaluation of low-dose metronomic (LDM) cyclophosphamide toxicity in cats with malignant neoplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(8), 671–678.
- Li, Z., Li, D., Tsun, A., & Li, B. (2015). FOXP3(+) regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & Molecular Immunology*, 2(November 2014), 1–8.
- Li, Z., Menoret, A., & Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 45-51.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 3(5), 361-370.
- Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine - mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175–1183.
- Lipari, F., McGibbon, G. A., Wardrop, E., & Cordingley, M. G. (2001). Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein. *Biochemistry*, 40(5), 1196–1204.

- Liu, C. C., Wang, Y. S., Lin, C. Y., Chuang, T. F., Liao, K. W., Chi, K. H., Chen, M., Chiang, H. & Chu, R. M. (2008). Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(4), 479–491.
- London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Follis, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P., Henry, C., Mitchener, K., Klein, M., Hintermeister, J., Bergman, P., Couto, G., Mauldin, G. & Michels, G. M. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, 15(11), 3856–3865.
- London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M. K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D., Hershey, B., Ettinger, S., Vaughan, A., Alvarez, F., Hillman, L., Kiselow, M., Thamm, D., Higginbotham, M., Gauthier, Krick, E., Philips, B., Ladue, T., Jones, P., Bryan, J., Gill, V., Novasad, A., Fulton, L., Carreras, J., Meneill, C., Henry, C. & Gillings, S. (2012). Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), 194–205.
- Loven, D., Hasnis, E., Bertolini, F., & Shaked, Y. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: From past experience to new paradigms in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, 18(3-4), 193-201.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012:925135.
- Luo, J. L., Maeda, S., Hsu, L. C., Yagita, H., & Karin, M. (2004). Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 6(3), 297–305.
- Madondo, M. T., Quinn, M., & Plebanski, M. (2016). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treatment Reviews*, 42, 3-9.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.
- Marconato, L., Bettini, G., Giacoboni, C., Romanelli, G., Cesari, a, Zatelli, A., & Zini, E. (2008). Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4):1001-7.
- Marconato, L., Frayssinet, P., Rouquet, N., Comazzi, S., Leone, V. F., Laganga, P., Rossi, F., Vignoli, M., Pessoli, L., & Aresu, L. (2014). Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 20(3), 668-77.
- Marconato, L., Stefanello, D., Sabattini, S., Comazzi, S., Riondato, F., Laganga, P., Frayssinet, P., Pizzoni, S., Rouquet, N., & Aresu, L. (2015). Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine*, 33(39), 5080–5086.
- McNeill, C. J., Sorenmo, K. U., Shofer, F. S., Gibeon, L., Durham, A. C., Barber, L. G., Baez, J., & Overlay, B. (2009). Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 123–129.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., Koszinowski, U. & Röcken, M. (2003). Natural killer cells activated by MHC class II targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 19(4), 561–569.
- Mohammed, S. I., Bennett, P. F., Craig, B. A., Glickman, N. W., Mutsaers, A. J., Snyder, P. W., Widmer, W., DeGortari, A., Bonney, P., & Knapp, D. W. (2002). Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Research*, 62(2), 356–358.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 618-631.
- Mutwiri, G., Pontarollo, R., Babiuk, S., Griebel, P., Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Mena, A., Tsang, C., Alcon, V., Nichani, A., Ioannou, X., Gomis, S., Townsend, H.,

- Hecker, R., Potter, A. & Babiuk, L. A. (2003). Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(2), 89-103.
- Neckers, L., & Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clinical Cancer Research*, 18(1), 64-76.
- Nguyen, S. M., Thamm, D. H., Vail, D. M., & London, C. A. (2015). Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 176-83.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Beury, D. W., & Clements, V. K. (2012). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 22(4), 275-281.
- Palomba, M. L. (2012). Active immunotherapy: Current state of the art in vaccine approaches for NHL. *Current Oncology Reports*, 14(5), 433-440.
- Pandya, P. H., Murray, M. E., Pollok, K. E., & Renbarger, J. L. (2016). The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1-13.
- Panjwani, N. N., Popova, L., & Srivastava, P. K. (2002). Heat Shock Proteins gp96 and hsp70 Activate the Release of Nitric Oxide by APCs. *The Journal of Immunology*, 168(6), 2997-3003.
- Paoloni, M., Mazcko, C., Selting, K., Lana, S., Barber, L., Phillips, J., Skorupski, K., Vail, D., Wilson, H., Avery, A., Kiupel, M., Le Blanc, A., Bernhardt, A., Brunkhorst, B., Tighe, R. & Khanna, C. (2015). Defining the pharmacodynamic profile and therapeutic index of NHS-IL12 immunocytokine in dogs with malignant melanoma. *PLoS One*, 10(6).
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21(Table 1), 807-39.
- Parodi, A. L., Misdorp, W., Mialot, J. P., Mialot, M., Hart, A. A. M., Hurtrel, M., & Salomon, J. C. (1983). Intratumoral BCG and *Corynebacterium parvum* therapy of canine mammary tumours before radical mastectomy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 15(3), 172-7.
- Parsell, D. (1993). The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 437-496.
- Pasquier, E., Kavallaris, M., & André, N. (2010). Metronomic chemotherapy: New rationale for new directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(8), 455-465.
- Pathan, M. M., Latif, A., Das, H., Siddiquee, G. M., & Khan, M. J. Z. (2010). Heat Shock Proteins and their clinical Implications. *Www.Veterinaryworld.Org Veterinary World*, 3(12), 558-560.
- Pavlin, D., Cemazar, M., Cör, A., Sersa, G., Pogacnik, A., & Tozon, N. (2011). Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiology and Oncology*, 45(1), 30-39.
- Pawaria, S., & Binder, R. J. (2011). CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nature Communications*, 2(1).
- Penel, N., Adenis, A., & Bocci, G. (2012). Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(1), 40-50.
- Phillips, J. C., Lembcke, L. M., Noltenius, C. E., Newman, S. J., Blackford, J. T., Grosenbaugh, D. A., & Timothy Leard, A. (2012). Evaluation of tyrosinase expression in canine and equin melanocytic tumors. *American Journal Veterinary Research*, 73(2), 272-278.
- Pinzon-Charry, A., Ho, C. S., Laherty, R., Maxwell, T., Walker, D., Gardiner, R. A., O'Connor, L., Pyke, C., Schmidt, C., Furnival, C., & Lopez, J. A. (2005). A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia*, 7(12), 1112-1122.
- Pio, R., Corrales, L., & Lambris, J. D. (2014). The role of complement in tumor growth. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 772, pp. 229-262).
- Pol, J., Bloy, N., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Hervé Fridman, W., Cremer, I., Zitvogel, L., Kroemer, G. & Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: DNA vaccines for cancer therapy. *OncoImmunology*, 3(4), 1-10.

- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M., & Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*, 47(3), 414–433.
- Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, 47(5), 450-455.
- Puccetti, P., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Ayroldi, E., Uyttenhove, C., Van Pel, A., Boon, T., & Grohmann, U. (1994). Use of a skin test assay to determine tumor-specific CD8+ T cell reactivity. *European Journal of Immunology*, 24(6), 1446-52.
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 267–296.
- Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H. Il, Antonia, S., Altioik, S., Celis, E. & Gabrilovich, D. I. (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4):1111-24.
- Randazzo, M., Terness, P., Opelz, G., & Kleist, C. (2012). Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *International Journal of Cancer*, 130(10), 2219-2231.
- Regan, D., Guth, A., Coy, J., & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *The Veterinary Journal*, 207, 20–28.
- Regan, D., & Dow, S. (2015). Manipulation of Innate Immunity for Cancer Therapy in Dogs. *Veterinary Sciences*, 2, 423-439.
- Richardson, P. G., Mitsiades, C. S., Laubach, J. P., Lonial, S., Chanan-Khan, A. A., & Anderson, K. C. (2011). Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *British Journal of Haematology*, 152(4), 367-379.
- Rivoltini, L., Castelli, C., Carrabba, M., Mazzaferro, V., Pilla, L., Huber, V., Coppa, J., Gallino, G., Scheibenbogen, C., Squarcina, P., Cova, A., Camerini, R., Lewis, J., Srivastava, P., & Parmiani, G. (2003). Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(7), 3467–3474.
- Romanucci, M., Bastow, T., & Della Salda, L. (2008). Heat shock proteins in animal neoplasms and human tumours--a comparison. *Cell Stress & Chaperones*, 13(3), 253–262.
- Romanucci, M., D'Amato, G., Malatesta, D., Bongiovanni, L., Palmieri, C., Ciccarelli, A., Buracco, P., Morello, E., Maniscalco, L., De Maria, R., Martano, M. & Della Salda, L. (2012). Heat shock protein expression in canine osteosarcoma. *Cell Stress & Chaperones*, 17(1), 131–138.
- Sá, A. I. S. (2016). *Avaliação dos efeitos secundários induzidos pela administração oral de ciclofosfamida em regime de quimioterapia metronômica em cães e gatos: estudo retrospectivo de 36 casos*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Saade, F., & Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 11(2), 189-209.
- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., & Garrido, C. (2006). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 15–27.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E. M., Van der Voort, E. I. H., Offringa, R., & Melief, C. J. M. (1998). T-cell help for cytotoxic T-lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393(6684), 480–483.
- Schreiber, T. H., & Podack, E. R. (2009). A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *British Journal of Cancer*, 101(3), 381-386.
- Schroeder, H. W., Cavacini, L., Schroeder Jr., H. W., Cavacini, L., Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy*

- and *Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52.
- Seelig, D., Avery, A., Ehrhart, E., & Linden, M. (2016). The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2).
- Selvarajah, G. T., Bonestroo, F. A., Kirpensteijn, J., Kik, M. J., van der Zee, R., van Eden, W., Timmermanssprang, E., Slob, A., & Mol, J. A. (2013). Heat shock protein expression analysis in canine osteosarcoma reveals HSP60 as a potentially relevant therapeutic target. *Cell Stress Chaperones*, 18(5), 607–622.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111.
- Sharpe, A. H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews*, 229(1), 5-11.
- Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., Damme, J. V., & Mantovani, A. (2000). Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- κ B Activation in Tumor-Associated Macrophages. *The Journal of Immunology*, 164(2), 762–767.
- Siddiqui, F., Li, C.-Y., Larue, S. M., Poulson, J. M., Avery, P. R., Pruitt, A. F., Zhang, X., Ulrich, R., Thrall, D., Dewhirst, M., & Hauck, M. L. (2007). A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(1), 380–389.
- Silveira, P. S. D. (2016). *Efeitos secundários da quimioterapia antineoplásica e seu impacto na qualidade de vida em cães e gatos com doença oncológica*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Simon, D., Nolte, I., Eberle, N., Abbrederis, N., Killich, M., & Hirschberger, J. (2006). Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4):948-54.
- Simonet, M., Rouquet, N., & Frayssinet, P. (2013). Hydroxyapatite powder for autovaccination against canine non Hodgkin's Lymphoma. In *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* (pp. 501–513). Londres: IntechOpen.
- Simonet, P., Josephine, A., Bayol, C., & Frayssinet, P. (2017). Treatment of two dogs with mast cell tumors using autologous immunotherapy. Retrieved May 20, 2018, from <http://www.urodelia.com/wp-content/uploads/2017/02/Treatment-of-two-dogs-with-mast-cell-tumors-using-autologous-immunotherapy.pdf>
- Simson, L., Ellyard, J. I., Dent, L. A., Matthaie, K. I., Rothenberg, M. E., Foster, P. S., Smyth, M., & Parish, C. R. (2007). Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4222–4229.
- Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E., & Schild, H. (2000). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *European Journal of Immunology*, 30, 2211–2215.
- Snyder, H. W., Hardy, W. D., Zuckerman, E. E., & Fleissner, E. (1978). Characterisation of a tumour-specific antigen on the surface of feline lymphosarcoma cells [20]. *Nature*, 275(5681), 656-658.
- Sredni, B., Weil, M., Khomenok, G., Lebenthal, I., Teitz, S., Mardor, Y., Ram, Z., Orenstein, A., Kershenovich, A., Michowiz, S., Cohen, Y., Rappaport, Z., Freidkin, I., Albeck, M., Longo, D. & Kalechman, Y. (2004). Ammonium Trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) Sensitizes Tumors to Chemotherapy by Inhibiting the Tumor Interleukin 10 Autocrine Loop. *Cancer Research*, 64(5), 1843–1852.
- Srivastava, P. K., & Das, M. R. (1984). The serologically unique cell surface antigen of zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *International Journal of Cancer*, 33(3), 417–422.
- Srivastava, P. K., DeLeo, A. B., & Old, L. J. (1986). Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3407–3411.
- Srivastava, P. K., & Maki, R. G. (1991). Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 167, 109–123.
- Stein, R., Balkman, C., Chen, S., Rassnick, K., McEntee, M., Page, R., & Goldenberg, D. M.

- (2011). Evaluation of anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody therapy in spontaneous canine lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 52(2), 273–284.
- Stenman, U. H., Leinonen, J., Zhang, W. M., & Finne, P. (1999). Prostate-specific antigen. *Seminars in Cancer Biology*, 9(2), 83–93.
- Street, S. E., Cretney, E., & Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97(1), 192–197.
- Sun, J. C., & Lanier, L. L. (2009). Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *European Journal of Immunology*, 39(8), 2059–2064.
- Sykes, M. (1990). Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *Journal of Immunology*, 145(10), 3209–3215.
- Talmadge, J. E., Hood, K. C., Zobel, L. C., Shafer, L. R., Coles, M., & Toth, B. (2007). Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *International Immunopharmacology*, 7(2), 140–151.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., & Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 278(5335), 117–120.
- Terabe, M., & Berzofsky, J. a. (2008). The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res.*, 101(08), 277–348.
- Testori, A., Richards, J., Whitman, E., Mann, G. B., Lutzky, J., Camacho, L., Parmiani, G., Tosti, G., Kirkwood, J., Hoos, A., Yuh, L., Gupta, R., & Srivastava, P. K. (2008). Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: The C-100-21 study group. *Journal of Clinical Oncology*, 26(6), 955–962.
- Tizard, I. (2012). *Veterinary Immunology* (9th ed., pp. 387–395). Missouri: Elsevier Saunders.
- Tsan, M. F. (2011). Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(6), 847–853.
- Tsan, M. F., & Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(6), 905–910.
- Tsung, K., Dolan, J. P., Tsung, Y. L., & Norton, J. A. (2002). Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Research*, 62(17), 5069–5075.
- U'Ren, L. W., Biller, B. J., Elmslie, R. E., Thamm, D. H., & Dow, S. W. (2007). Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), 113–120.
- Udono, H., & Srivastava, P. K. (1994). Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(11), 5398–5403.
- Urban, E. M., Chapoval, A. I., & Pauza, C. D. (2010). Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human gammadelta T cells. *Clinical & Developmental Immunology*, 2010, 732893.
- Urodelia. (2017). APAVAC, what is it? Retrieved April 15, 2018, from <http://www.urodelia.com/en/immunotherapy-in-oncology/apavac-what-is-it/>
- Urodelia. (2018). How to prepare autologous treatment doses for veterinary use. Saint Lys, França.
- Vail, D. M., Michels, G. M., Khanna, C., Selting, K. A., & London, C. A. (2010). Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0)-a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(1), 28–37.
- Vail, D., Pinkerton, M., & Young, K. (2013). Hematopoietic Tumors. In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed., pp. 608–678). Missouri: Elsevier Saunders.
- Vicari, A. P., & Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13(2), 143–154.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature*

- Medicine*, 10(8), 789-799.
- Waldhauer, I., & Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, 27(45), 5932-5943.
- Walter, C. U., Biller, B. J., Lana, S. E., Bachand, A. M., & Dow, S. W. (2006). Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), 342-347.
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(Suppl 1), S1.
- Wills-Karp, M. (2007). Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4(3), 247-251.
- Withrow, S., Vail, D., & Page, R. (2013). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed.). Missouri: Elsevier Saunders.
- Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2006). Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 16(2), 115-123.
- Ye, X. Z., Yu, S. C., & Bian, X. W. (2010). Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(7), 423-430.
- Zahm, C. D., Colluru, V. T., & McNeel, D. G. (2017). DNA vaccines for prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 174, 27-42.
- Zhang, J., Basher, F., & Wu, J. D. (2015). NKG2D ligands in tumor immunity: Two sides of a coin. *Frontiers in Immunology*, 6(MAR).
- Zhang, Y., & Zheng, L. (2013). Tumor immunotherapy based on tumor-derived heat shock proteins (review). *Oncology Letters*, 6(6), 1543-1549.
- Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2011). Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(3), 151-60.

Parte III

ANEXOS

Anexo 1: KIT para preparação de 8 vacinas autólogas para uso veterinário (adaptado de Urodelia, 2018; Simonet et al., 2013).

Passo I: EXTRAÇÃO

E1. Preparação da solução para homogeneização

1. Em condições de assépsia, extrair 0,5 cm³ de tumor e cortá-lo em pequenos fragmentos;
2. Colocar os fragmentos num tubo estéril contendo esferas de cerâmica;
3. Utilizar a seringa de 5 mililitros para adicionar 4 mililitros do solvente A [solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 30 mmol/L, pH 7];
4. Agitar vigorosamente.

E2. Homogeneização do tumor

1. Aguardar 3 minutos e, se necessário, agitar novamente;
2. Com o auxílio de uma pipeta, transferir a totalidade da solução resultante para um tubo de centrífuga estéril, evitando fragmentos residuais do tumor.

E3. Centrifugação e obtenção do sobrenadante

1. Centrifugar a 6000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, para obter uma separação evidente entre o sedimento (restos celulares) e a fase líquida;
2. Preservar o líquido sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo de centrífuga estéril.

E4. Mistura do sobrenadante com o solvente B

1. Utilizar a seringa de 5 mililitros para colocar num novo tubo estéril uma quantidade de solvente B (sulfato de amónia) igual à quantidade de sobrenadante obtido anteriormente;
2. Misturar o conteúdo dos dois tubos, transferindo os respetivos conteúdos de um para o outro (pelo menos 6 vezes), até se obter uma solução homogénea em ambos;
3. Refrigerar ambos os tubos no frigorífico (4°C) durante 60 minutos.

E5. Centrifugar uma segunda vez e guardar o sedimento

1. Após 60 minutos no frigorífico é visível um precipitado nos tubos. Centrifugar ambos os tubos a 6000 rpm durante 30 minutos, para concentrar no sedimento as proteínas em suspensão;
2. Desprezar o sobrenadante de ambos os tubos;
3. Preservar o sedimento de ambos os tubos.

E6. Adicionar o solvente C ao tubo 1

1. Utilizar a seringa de 5 mililitros para adicionar 1 mililitro do solvente C (tampão fosfato, 20 mmol/L, pH 7) ao sedimento, em cada um dos tubos;
2. Agitar vigorosamente até os sedimentos estarem completamente dissolvidos;
3. Transferir o conteúdo do tubo 1 para o tubo 2;
4. Agitar.

Passo II: PURIFICAÇÃO

PU1. Transferência da solução de extração (passo I) para a coluna de cromatografia

1. Abrir o topo da coluna de cromatografia, agitar o tubo com a solução de extração, se necessário e, verter para ela o seu conteúdo;
2. Cobrir a coluna com o adaptador e a seringa de 5 mililitros (sem agulha e com o êmbolo em posição); agitar vigorosamente; esperar 3 minutos para que o material em suspensão assente;
3. Remover a seringa, enchê-la de ar e recolocá-la no adaptador; abrir o fundo da coluna de cromatografia;
4. Pressionar lentamente o êmbolo, promovendo a envolvimento do material pelo líquido contido na coluna de cromatografia; permitir a drenagem do líquido em excesso.

PU2. Lavagem da coluna de cromatografia com o solvente C

1. Utilizar a seringa de 5 mililitros com uma agulha acoplada para extrair 3 mililitros do solvente C; remover a agulha e, de seguida, adicionar este solvente na coluna;
2. Pressionar lentamente o êmbolo, permitindo que todo o líquido entre na coluna; permitir a drenagem do líquido em excesso; aguardar 2 minutos;
3. Remover a seringa, aspirar 5-10 mililitros de ar e injetá-lo na coluna, permitindo, deste modo, a drenagem do líquido em excesso; aguardar 2 minutos; remover a seringa e repetir o procedimento, se necessário.

PU3. Adicionar o solvente D à coluna de cromatografia

1. Encerrar o fundo da coluna de cromatografia;
2. Acoplar uma agulha à seringa de 5 mililitros, aspirar 4 mililitros do solvente D (carboximetilcelulose a 2%) e injetá-lo na coluna de cromatografia.

Passo III: PREPARAÇÃO DA VACINA

PP1. Dividir a solução preparada em 8 doses

1. Acoplar uma das 8 seringas de 1 mililitro ao adaptador da coluna (tampa inferior da coluna aplicada);
2. Agitar vigorosamente a coluna, durante pelo menos 1 minuto, até todo o material estar em suspensão;
3. Com a coluna virada ao contrário (tampa vermelha para cima), aspirar 0,5 mililitros da preparação para a seringa; acoplar uma agulha à seringa;
4. Repetir o procedimento anterior 7 vezes, agitando vigorosamente durante pelo menos 10 segundos antes de efetuar a aspiração do conteúdo (repetir mais de 7 vezes caso exista solução em excesso).

Passo IV: IDENTIFICAÇÃO E ACONDICIONAMENTO

1. Preencher e aplicar etiquetas individuais nas 8 seringas, contendo as seguintes informações: nome do animal, nome do tutor do animal e data de preparação;
2. Colocar as 8 seringas na caixa de armazenamento e etiquetá-la com as seguintes informações: nome do animal, nome do tutor do animal, data de preparação, local de preparação e o nome do operador responsável pelo fabrico da vacina;
3. Colocar a caixa de armazenamento no congelador (-18°C).

Passo V: APLICAÇÃO

1. Retirar do congelador 5-10 minutos antes de se realizar a administração;
2. Aspirar 0,5 mililitros de ar e agitar bem durante pelo menos 20 segundos, até se obter uma suspensão homogênea;
3. Retirar o ar e injetar por via subcutânea todo o conteúdo da seringa.

Anexo 2: Sistemas de estadiamento clínico para o linfoma, carcinoma mamário, melanoma oral, sarcoma de tecidos moles e sarcóide felino.

Tabela 1a: Classificação do linfoma quanto à sua localização anatômica, segundo a OMS/WHO (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013)

| Localização anatômica |
|------------------------------|
| Generalizado |
| Alimentar |
| Tímico |
| Cutâneo |
| Leucemia (verdadeira)* |
| Outros (incluindo o renal) |

*Envolvimento do sangue e medula óssea, apenas.

Tabela 1b: Sistema de estadiamento clínico para o linfoma, segundo a OMS/WHO (adaptado de Whithrow, Vail & Paige, 2013).

| Estádio |
|--|
| I. Envolvimento limitado a um único linfonodo ou a um tecido linfoide, num único órgão*. |
| II. Envolvimento de vários linfonodos numa região do corpo. |
| III. Envolvimento generalizado dos linfonodos. |
| IV. Envolvimento do fígado e/ou baço. |
| V. Manifestação na corrente sanguínea, envolvimento da medula óssea e/ou outro sistema orgânico. |
| Cada estágio é subclassificado em: |
| a. Sem sinais sistêmicos |
| b. Com sinais sistêmicos |

*Excluindo a medula óssea.

Tabela 2: Estadiamento clínico das neoplasia mamárias felinas, baseado na classificação TNM (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013).

| Estádio | Dimensão do tumor | Estado dos linfonodos | Metástases |
|----------------|--------------------------|------------------------------|-------------------|
| Estádio I | T1 < 2 cm | N0 | M0 |
| Estádio II | T2 2-3 cm | N0 | M0 |
| Estádio III | T1 ou T2 | N1 (positivo) | M0 |
| | T3 > 3 cm | N0 ou N1 | M0 |
| Estádio IV | Qualquer | Qualquer | M1 |

Tabela 3: Estadiamento clínico do melanoma oral canino, baseado na classificação TNM (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013).

| |
|--|
| T: Tumor primário |
| T1: Tumor com diâmetro \leq 2 cm. |
| T2: Tumor com diâmetro entre 2-4 cm. |
| T3: Tumor com diâmetro $>$ 4 cm. |
| N: Linfonodos regionais |
| N0: Sem evidência de envolvimento dos linfonodos regionais. |
| N1: Evidência histológica/citológica de envolvimento dos linfonodos regionais. |
| N2: Linfonodos fixos. |
| M: Metástases à distância |
| M0: Sem evidência de metástases à distância. |
| M1: Evidência de metástases à distância. |

Estádio I: T1 N0 M0

Estádio II: T2 N0 M0

Estádio III: T2 N1 M0 ou T3 N1 M0

Estádio IV: qualquer T, qualquer N e M1.

Tabela 4: Estadiamento clínico dos sarcomas de tecidos moles caninos, baseado na classificação TNM (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013).

| |
|---|
| T: Tumor Primário |
| T1: Tumor com diâmetro \leq 5 cm. |
| T1a: Tumor superficial. |
| T1b: Tumor profundo. |
| T2: Tumor com diâmetro $>$ 5 cm. |
| T2a: Tumor superficial. |
| T2b: Tumor profundo. |
| N: Linfonodos Regionais |
| N0: Sem evidência de metástases nos linfonodos regionais. |
| N1: Evidência de metástases nos linfonodos regionais. |
| M: Metástases à distância |
| M0: Sem evidência de metástases à distância. |
| M1: Evidência de metástases à distância. |

(continuação da Tabela 4)

| Estádio | Tumor (T) | Linfonodos regionais (N) | Metástases (M) | Grau histológico |
|----------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| I | Qualquer T | N0 | M0 | I-II |
| II | T1a-1b, T2a | N0 | M0 | III |
| III | T2b | N0 | M0 | III |
| IV | Qualquer T | N1 | Qualquer M | I-III |
| | Qualquer T | Qualquer N | M1 | I-III |

Tabela 5: Estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas, baseado na classificação TNM (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013).

| Estádio | Tamanho do tumor | Linfonodos | Metástases |
|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Estádio I | T1 < 3 cm | N0 | M0 |
| Estádio II | T2 3-5 cm | N0 | M0 |
| Estádio III | T3 > 5 cm | N0 | M0 |
| Estádio IV | Qualquer | N1 (positivo) | M0 |
| Estádio V | Qualquer | Qualquer | M1 (metástases) |

Tabela 6: Estadiamento clínico dos tumores cutâneos com origem na epiderme e derme, com base na classificação TNM (adaptado de Withrow, Vail, & Page, 2013).

T: Tumor Primário

T0: Sem evidência do tumor

Tis: Carcinoma *in situ*

T1: Tumor com diâmetro máximo <2 cm, superficial ou exofítico

T2: Tumor com diâmetro máximo entre 2-5 cm ou minimamente invasivo, independentemente do tamanho

T3: Tumor com diâmetro máximo >5 cm ou com invasão da *subcutis* independentemente do tamanho

T4: Tumor invade outras estruturas (fáscia, músculo, osso ou cartilagem)

N: Linfonodos Regionais

N0: Sem evidência de envolvimento dos linfonodos regionais

N1: Linfonodos ipsilaterais móveis

N1a: Linfonodos considerados não-metastáticos

N1b: Linfonodos considerados metastáticos

N2: Movimento contralateral ou bilateral dos linfonodos

N2a: Linfonodos considerados não-metastáticos

N2b: Linfonodos considerados metastáticos

N3: Linfonodos fixos

(continuação da tabela 6)

M: Metástases à distância

M0: Sem evidência de metástases à distância

M1: Evidência de metástases à distância

Anexo 3: Classificação, em graus, dos efeitos secundários avaliados durante a quimioimunoterapia.

Tabela 1: Classificação, em graus, da toxicidade hematopoiética (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Toxicidade hematopoiética | | | | | | |
|---------------------------|------|-------------|----------------|----------------|-----------|-------|
| Graus | | 1* | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Neutrófilos | | ≥1500/μL | 1000-1499/μL | 500-999/μL | <500/μL | Morte |
| Plaquetas | | ≥1000000/μL | 50000-99999/μL | 25000-49000/μL | <25000/μL | |
| Hematócrito | Gato | >25% | 20-25% | 15-20% | <15% | |
| | Cão | >30% | 20-30% | 15-20% | <15% | |

Legenda: * inclui valores até ao parâmetro de referência considerado normal para a espécie.

Tabela 2: Classificação, em graus, da toxicidade renal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Toxicidade renal | | | | | | |
|------------------|------|----------------|----------------|---------------|------------|---|
| Graus | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Creatinina | Gato | 1,9-2,85 md/dL | 2,85-3,8 mg/dL | 3,8-5,7 mg/dL | >5,7 mg/dL | - |
| | Cão | 1,6-2,4 mg/dL | 2,4-3,2 mg/dL | 3,2-4,8 mg/dL | >4,8 mg/dL | |

Tabela 3: Classificação, em graus, da toxicidade hepática (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Toxicidade hepática | | | | | | |
|---------------------|------|----------------|------------------|----------------|------------|---|
| Graus | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| ALP | Gato | 125-156,3 IU/L | 156,3-187,5 IU/L | 187,5-250 IU/L | >250 IU/L | - |
| | Cão | 130-325 IU/L | 325-650 IU/L | 650-2600 IU/L | >2600 IU/L | |
| ALT | Gato | 105-131 IU/L | 131-157,5 IU/L | 157,5-210 IU/L | >210 IU/L | |
| | Cão | 113-169,5 IU/L | 169,5-452 IU/L | 452-1130 IU/L | >1130 IU/L | |

Tabela 4: Classificação, em graus, da toxicidade gastrointestinal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Toxicidade gastrointestinal | | | | | |
|-----------------------------|--|---|--|---|-------|
| Graus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Diarreia | Aumento de 2 defecações/dia, acima do normal, sem aumento da frequência e consistência diminuída | Aumento de 3-6 defecações/dia, acima da frequência normal | >6 defecações/dia acima da frequência normal e incontinência fecal >48 horas | Perigo de vida por colapso hemodinâmico | Morte |
| Vômito | <3 episódios em 24 horas | 3-10 episódios em 24 horas, ≤5 episódios por dia durante 48 horas | Múltiplos episódios durante mais de 48 horas | Perigo de vida por colapso hemodinâmico | |
| Náusea | Perda de apetite sem alteração dos hábitos alimentares | Grau 2 anorexia | Grau 3 anorexia | Grau 4 anorexia | |
| Anorexia | Mudança da dieta para manter apetite | Anorexia ≤3 dias, sem perda de peso significativa | Anorexia >3 dias, perda de peso ≥10% ou má nutrição | Em risco de vida | |

Tabela 5: Classificação, em graus, da toxicidade no local de administração (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Toxicidade no local de administração | | | | | |
|---|--|--|---|---------------|-------|
| Graus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Reações relacionadas com a infusão | Reação moderada transitória; interrupção da infusão não indicada | Interrupção da infusão indicada, responde ao tratamento médico | Resposta lenta à medicação e/ou interrupção da infusão, hospitalização necessária | Risco de vida | Morte |

(continuação da tabela 5)

| | | | | | |
|---|---|--|--|---------------|-------|
| Extravasão no local de administração | - | Eritema associado a edema, dor e flebite | Ulceração ou necrose dos tecidos graves; indicação de cirurgia | Risco de vida | Morte |
| No local de administração | Desconforto associado a rubor, eritema ou prurido | Dor; lipodistrofia; edema; flebite | Ulceração ou necrose dos tecidos graves; indicação de cirurgia | Risco de vida | |
| Outros | Ligeiros | Moderado | Grave | Risco de vida | |

Tabela 6: Classificação, em graus, das reações imuno-alérgicas (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

| Reações imuno-alérgicas | | | | | |
|---|---|---|--|---------------|----------|
| Graus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Reação alérgica ou de hipersensibilidade | Urticária ou erupção cutânea transitória; febre <40°C; sem necessidade de intervenção | Indicada a interrupção; responde ao tratamento médico | Resposta lenta à medicação e/ou interrupção da infusão, hospitalização necessária | Risco de vida | Morte |
| Anafilaxia | - | - | Broncospasmo, com ou sem urticária; intervenção parenteral indicada; edema ou angioedema; hipotensão | Risco de vida | |

(continuação da tabela 6)

| | | | | | |
|-------------------------|---|--|--|--|-------|
| Reação autoimune | Reação subclínica, com função orgânica normal, intervenção não indicada | Reação autoimune envolvendo órgão/função não essencial | Reação reversível envolvendo a função de órgão essencial | Risco de vida | Morte |
| Vasculite | Ligeira, intervenção não indicada | Terapêutica com AINE indicada | Terapêutica com esteróide indicada | Lesão isquêmica; amputação ou desbridamento cirúrgico indicado | |
| Outros | Ligeiros | Moderado | Grave | Risco de vida | |

Anexo 4: Efeitos secundários relacionados com a administração de fármacos citotóxicos.

Tabela 1: Descrição dos efeitos secundários relacionados com a administração de fármacos citotóxicos, durante a quimioterapia dos animais em estudo (adaptado de Withrow et al., 2013).

| Fármaco citotóxico | Família | Efeitos secundários |
|---------------------------|--------------------------|--|
| Ciclofosfamida | Agente alquilante | Hematológicos: neutropénia e trombocitopénia; Gastrointestinais (mais em gatos): náusea e vômito; Dermatológicos: alopecia em cães com pelo de crescimento contínuo; Urinários: cistite hemorrágica estéril. |
| Clorambucil | Agente alquilante | Hematológicos: mielosupressão (neutropénia e trombocitopénia). |
| Lomustina | Agente alquilante | Hematológicos: mielosupressão (neutropénia e trombocitopénia); Toxicidade hepática quando administrada cronicamente. |
| Dacarbazina | Agente alquilante | Toxicidade gastrointestinal; Hematológicos: mielosupressão. |
| Doxorrubicina | Antibiótico anti-tumoral | Hipersensibilidade durante a administração; Lesão perivascular após extravasão; Hematológicos: mielosupressão; Gastrointestinais; Cardiotoxicidade (dose cumulativa 120-150 mg/m ²); Renais: lesão tubular renal (gatos). |
| Mitoxantrona | Antibiótico anti-tumoral | Lesão perivascular após extravasão; Gastrointestinais. |
| Citarabina | Anti-metabolito | Hematológicos: mielosupressão; Gastrointestinais (ocasionalmente). |
| Vincristina | Agente anti-tubulina | Lesão perivascular após extravasão; Hematológicos: mielosupressão; Neurológicos: neuropatia periférica (raro); Gastrointestinais: constipação (gatos). |

(continuação da tabela 1)

| | | |
|----------------|---|--|
| Prednisolona | Esteróide | Poliúria, polidipsia, polifagia, perda de massa muscular, alterações comportamentais. |
| L'asparaginase | Agente enzimático | Reações de hipersensibilidade (anafilaxia) após a administração; Hematológicos: mielosupressão (raro); Outros: coagulação intravascular disseminada e pancreatite (raros). |
| Toceranib | Inibidor dos recetores tirosina quinase | Gastrointestinais, incluindo hemorragias; Hematológicos: mielosupressão (anemia); Renais: azotémia, nefropatia com perda de proteína (proteinúria); Alterações do estado geral: letargia; Claudicação. |